

Entwicklung, Synthese und Charakterisierung neuartiger Furininhibitoren

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Gero Lutz Becker
aus Ulm

Marburg/Lahn 2011

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 14.02.2011 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Torsten Steinmetzer

Zweitgutachter: Dr. habil. Manuel E. Than

Tag der mündlichen Prüfung am: 15.02.2011

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	iv
Tabellenverzeichnis	vi
Abkürzungsverzeichnis	vii
1 Einleitung	1
1.1 Influenza	1
1.2 Hemmung der Virusausbreitung	3
1.2.1 Vermehrungszyklus	3
1.2.2 Angriffspunkte zur Hemmung der Virusvermehrung	4
1.2.3 Hämagglutinin-Spaltung	6
1.3 Proproteinkonvertasen	6
1.4 Furin	9
1.4.1 Autokatalytische Aktivierung des Furins	10
1.4.2 Intrazelluläre Lokalisation des Furins	10
1.4.3 Furinkatalysierte Prozesse in der Zelle	12
1.4.4 Furininhibitoren	14
1.4.5 Kristallstruktur des Furins	17
1.5 Ziel der Arbeit	19
2 Ergebnisse und Diskussion	21
2.1 Entwicklung und Optimierung des P1-Restes	21
2.1.1 Entwicklung des P1-Restes	21
2.1.2 Synthese der P1-Derivate	22
2.1.3 Bestimmung der Inhibitorkonstanten	27
2.2 Modifizierungen am P5-Rest	31
2.2.1 Fettsäurederivate	31
2.2.2 Untersuchungen zur Partikelgröße und Mizellenbildung	37
2.2.3 Hydrophobe aromatische P5-Derivate	39
2.2.4 Basische P5-Derivate	39
2.3 Modifizierung der P3-Position	45
2.4 Weitere Inhibitorstrukturen	46
2.4.1 Lysin-Derivate	46
2.4.2 Citrullin- und N-Methylarginin-Derivate	49
2.4.3 D-Arginin-Derivate	50
2.5 Hemmung anderer Proproteinkonvertasen	51
2.6 Modellierter Komplex des Inhibitors 74 in Furin	53

2.7	Stabilitätsuntersuchungen	57
2.7.1	Stabilität des Inhibitors 17 in Wasser	57
2.7.2	Stabilität der Inhibitoren in Zellkulturmedium	58
2.8	Untersuchungen zur Zytotoxizität und Virusvermehrung	60
2.8.1	Zytoxizitätsuntersuchungen	60
2.8.2	Spaltungshemmung des FPV-Hämagglutinins	61
2.8.3	Untersuchungen zur Virusausbreitung	64
2.8.4	Untersuchung zur Hemmung der multizyklischen Replikation	66
2.8.5	Quantitative Bestimmung infektiöser Viruspartikel	68
2.9	Biotinylierte Inhibitoren	69
2.10	AMC-Substrate für Furin	72
3	Zusammenfassung und Ausblick	75
3.1	Synthese und Optimierung der Furininhibitoren	75
3.1.1	P1-Gruppe	75
3.1.2	P2- und P4-Gruppe	76
3.1.3	P3-Gruppe	76
3.1.4	P5-Gruppe: Fettsäuren	77
3.1.5	P5-Gruppe: basische Reste	77
3.2	Untersuchungen zur Zytotoxizität und Virusvermehrung	78
3.3	Biotinylierte Derivate und AMC-Substrate	79
3.4	Zukünftige Möglichkeiten	80
4	Experimenteller Teil	81
4.1	Material und Methoden	81
4.1.1	Peptidsynthese	81
4.1.2	HPLC und Lyophilisierung	81
4.1.3	NMR- und Massenspektroskopie	82
4.1.4	Reagenzien	82
4.2	Enzymkinetik	82
4.2.1	Standardbestimmung der Inhibitoraktivität	82
4.2.2	Bestimmung der IC ₅₀ -Werte	83
4.2.3	„Active-site“-Titration	84
4.2.4	„Tight-binding“-Kinetik	84
4.3	Stabilitätsuntersuchungen der Inhibitoren in Zellkultur	85
4.4	Synthese der Inhibitoren	86
4.4.1	Allgemeines	86
4.4.2	Generelle Methoden	86
4.4.3	Synthese der Vorstufen	89
4.4.4	Synthese von Ac-Arg-Val-Arg-P1	90
4.4.5	Synthese von Phac-Arg-Val-Arg-P1	91
4.4.6	Synthese von P5-Arg-Val-Arg-4-Amba	93
4.4.7	Synthese von Phac-Arg-P3-Arg-4-Amba	95
4.4.8	Lysin- und <i>homo</i> -Arginin-Derivate	95

4.4.9	Synthese von Verbindungen mit D-Arginin	98
4.4.10	Biotinylierte Verbindungen	98
4.4.11	Sonstige Inhibitoren	99
4.4.12	Synthese der AMC-Substrate	100
5	Literaturverzeichnis	101
A	Publikationen	I
B	Messparameter des Enzym-Tests und AMC-Eichkurve	III
C	Virologische Methoden	V
C.1	Zellkulturen, Virus-Stamm- und Inhibitor-Lösungen	V
C.2	Zytotoxizitätstest	V
C.3	Immunfärbung	V
C.4	Bestimmung der Virusausbreitung	VI
C.5	Multizyklische Replikation und Plaque-Test	VI
C.6	SDS-PAGE und Western-Blot Analyse	VI
D	Danksagung	IX
E	Lebenslauf	XI
F	Erklärung	XIII

Abbildungsverzeichnis

1.1	Vermehrungszyklus des Influenzavirus	4
1.2	HA-vermittelte Fusion des Virus mit der Endosomenmembran	5
1.3	Schematische Darstellung der Domänenstruktur der Protease	9
1.4	Schematische Darstellung der autokatalytischen Aktivierung Furins	10
1.5	Modell der Furinlokalisierung in der Zelle	11
1.6	Aktivierung einiger Proteine durch Furin im TGN oder endosomalen System	13
1.7	Einteilung von Furininhibitoren	14
1.8	Strukturen ausgewählter Furininhibitoren	17
1.9	Interaktionen zwischen dem P1-Rest (Dec-RVKR-CMK) und Furin	18
	(a) S1-Tasche	18
	(b) Bindungen an der P1-Carbonylgruppe	18
1.10	Dec-RVKR-CMK	19
2.1	Syntheschema von aliphatischen Aminen und Guanidinen in P1	23
2.2	Syntheschema für cyclische Amine und Guanidine in P1	26
2.3	Bestimmung des K_i -Wertes von Inhibitor 17	28
	(a) Messwerte der kompetitiven Hemmung	28
	(b) Dixon-Auftragung	28
2.4	Vergleich der K_i -Werte unterschiedlicher P1-Derivate	29
2.5	Einfluss der Kettenlänge in P5-Position auf den K_i -Wert	34
2.6	Dixon-Auftragung des Inhibitors 27	35
2.7	IC_{50} -Kurven und Korrelation von K_i - und IC_{50} -Werten	36
	(a) IC_{50} -Kurven	36
	(b) Korrelation K_i - und IC_{50} -Wert	36
2.8	IC_{50} -Werte für Inhibitoren mit C18-Fettsäureresten	37
2.9	Streulichtmessung von Fettsäurederivaten in Puffer	38
2.10	Bestimmung der Furin-Konzentration durch „active-site“-Titration	41
2.11	Ergebnisse der „active-site“-Titration	42
2.12	„Tight-binding“-Auswertung der Inhibitoren 37 und 38	43
2.13	K_i -Werte basischer und hydrophober P5-Reste	44
2.14	Hemmung des Furins durch P3-Derivate	45
2.15	Vergleich der K_i -Werte von Lysin-Derivaten	49
2.16	Stereobild des modellierten Komplexes aus Inhibitor 74 in Maus-Furin	54
2.17	Darstellung der Furinbindetaschen im Komplex mit Inhibitor 74	56
	(a) S1-Tasche	56
	(b) S2-Tasche	56
	(c) S3-Tasche	56

(d) S4–S5-Tasche	56
2.18 Stabilität des Inhibitors 17 in Wasser	58
2.19 Stabilitätsuntersuchungen der Inhibitoren 32 und 40	59
(a) Stabilität des Inhibitors 32	59
(b) Stabilität des Inhibitors 40	59
2.20 Viabilität von MDCK-Zellen nach Inhibitorbehandlung	61
2.21 Spaltungshemmung und -quantifizierung der Inhibitoren 17 , 32 und 40 . .	63
(a) HA-Spaltungsinhibition durch Inhibitor 17 und Dec-RVKR-CMK	63
(b) HA-Spaltungsinhibition durch Inhibitor 32 und 40	63
2.22 Hemmung der Virusausbreitung durch Inhibitoren 32 , 38 und 40	65
2.23 Hemmung der multizyklischen Replikation durch Inhibitor 17	66
2.24 Multizyklische Replikation: Hemmung durch P5-Derivate	67
2.25 Quantitative Bestimmung infektiöser Viruspartikel	69
(a) Log10 Auftragung der PFU gegen die Zeit	69
(b) Normierte, lineare Auftragung der PFU	69
2.26 ν/S -Charakteristik verschiedener Furinsubstrate	73
B.1 AMC-Eichkurve in Furin-Messpuffer	IV

Tabellenverzeichnis

1.1	Proteinkonvertasen	7
1.2	Knockout-Phenotypen der furinartigen Proteinkonvertasen	8
1.3	Beispiele für Furininhibitoren	16
2.1	Variationen des P1-Restes (Strukturen und K_i -Werte)	24
2.1	Variationen des P1-Restes (Strukturen und K_i -Werte), Fortsetzung	25
2.2	Modifizierungen des P5-Restes	31
2.2	Modifizierungen des P5-Restes, Fortsetzung	32
2.2	Modifizierungen des P5-Restes, Fortsetzung	33
2.3	K_i -Werte der Lysin-Derivate	47
2.3	K_i -Werte der Lysin-Derivate, Fortsetzung	48
2.4	Citrullin- und N-Methylarginin-Derivate	50
2.5	Hemmung verschiedener PCs durch ausgewählte Inhibitoren	52
2.6	Ausgangsstrukturen und daraus abgeleitete biotinylierte Inhibitoren	71
2.7	AMC-Substrate für Furin	72
2.7	AMC-Substrate für Furin, Fortsetzung	73
4.2	Messansatz des Standardenzymtests	83
4.3	Programm für die automatische SPPS	87
4.4	Verwendete Fmoc-Aminosäurederivate für die SPPS	88
4.5	Synthese der Verbindungen 7–14	91
4.6	Synthese der Verbindungen 20–41	94
4.7	Analytik von Phac-Arg-P3-Arg-4-Amba	96
4.8	Synthese der Lysin-Derivate 71–76	97
B.1	Messparameter des Plattenlesers Tecan SAFIRE II	III

Abkürzungsverzeichnis

4-Amba	4-(Amidino)benzylamin/-id
6-Cl-HOBt	6-Chloro-1-hydroxybenzotriazol
<i>h</i> -Furin	humanes Furin
<i>h</i> Arg	<i>homo</i> -Arginin
abs.	absolut
Ac	Acetyl
ACN	Acetonitril
Ado	8-(Amino)-3,6-dioxa-octansäure
AMC	7-Aminomethylcoumarin
AS	Aminosäure
ber.	berechnet
Boc	<i>t</i> -Butyloxycarbonyl
BSA	Rinderserum-Albumin
Cbz	Benzyloxycarbonyl
Cbz-OSu	Benzyloxycarbonyl- <i>N</i> -hydroxysuccinimid
Cit	Citrullin
CMC	kritische Mizellbildungskonzentration
CMK	Chlormethylketon
Dap	2,3-Diaminopropionsäure
DCM	Dichlormethan
Dec	Decanoyl
demin.	demineralisiert über Umkehrosmose
DIPEA	Diisopropylethylamin, Hünig Base
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
eq	Äquivalent(e)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FPV	‘fowl plague virus’, Klassische Geflügelpest, auch KP-Virus
gef.	gefunden
HA	Hämagglutinin
HAU	Hämagglutinationseinheiten (Hemagglutination Units)
HBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium · PF ₆ ⁻
HOBt	Hydroxybenzotriazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HV	Hochvakuum
<i>I</i> C ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration (50 % Hemmung)
<i>K</i> _i	Inhibitorkonstante

K_m	Michaelis-Menten-Konstante
MDCK	Madin-Darby canine kidney (Cells)
MOI	Multiplicity of Infection
Mtr	4-Methoxy-2,3,6-trimethylphenylsulfonyl
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NMP	N-Methyl-2-pyrrolidon
NP	Nucleoprotein
OtBu	O- <i>t</i> -Butylester
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PC	Proteinkonvertase
PFA	Paraformaldehyd
PFU	‘Plaque forming units’, Kolonien bildende Einheiten
Phac	Phenylacetyl
PTFE	Polytetrafluorethylen
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-pyrrolidinophosphonium · PF ₆ ⁻
Pyr	Pyroglutaminsäure
RT	Raumtemperatur
SPPS	Festphasenpeptidsynthese, ‘Solid Phase Peptide Synthesis’
tBu	<i>t</i> -Butylether
TFA	Trifluoressigsäure
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
t_R	Retentionszeit HPLC
Trt	Trityl
V_{max}	Maximalgeschwindigkeit des Enzyms

1 Einleitung

1.1 Influenza

Die saisonale Grippe verursacht jedes Jahr allein in Deutschland durchschnittlich 8 000–10 000 Todesopfer [1], in der Saison 1995/96 wurde sogar von 31 000 Sterbefällen berichtet. Das Influenzavirus stellt aber nicht nur dadurch eine Bedrohung für die Bevölkerung dar, sondern auch aufgrund der immer wieder auftretenden Pandemien, die durch diese Viren ausgelöst werden. Im Jahr 1918/19 kam es durch den Ausbruch der Spanischen Grippe zu 50 Millionen oder mehr Toten weltweit [2]. Das damals aufgetretene Virus des Typs H1N1 stammte ursprünglich aus Vögeln. Bis heute zirkulieren Viren dieses Serotyps im Menschen [3]. Im 20. Jahrhundert traten noch weitere Pandemien auf, wie die Asiatische Grippe in 1957/58 (H2N2) oder die Hongkong-Grippe in 1968/69 (H3N2). Die Erreger dieser pandemischen Grippewellen im Menschen gehören alle zur Gattung der Influenza-A-Viren, die auch in Vögeln, Schweinen, Pferden sowie in einer Reihe anderer Säugetiere vorkommen [4]. Außerdem gibt es noch zwei weitere Gattungen, die Influenza-B- und C-Viren, die in der Regel nur im Menschen auftreten. Influenza-C verursacht bei einer Infektion im Vergleich zu den anderen Typen aber nur relativ milde Krankheitsverläufe, die einer Erkältung ähneln [5,6].

Die Erreger der pandemischen Grippewellen nach 1918 waren Reassortanten aus humanen und aviären Influenza-A-Viren, die sich ursprünglich aus der Spanischen Grippe entwickelt haben [7]. Auch im 21. Jahrhundert ist durch den Ausbruch der sogenannten „Schweinegrippe“ in 2009, einem Virus des Subtyps H1N1, eine Pandemie ausgelöst worden, deren Verlauf sich milder als zunächst angenommen darstellte. Es traten dabei aber dennoch einige schwere Krankheitsfälle auf, unter anderem bei jüngeren Patienten. Sämtliche saisonale Influenzaviren, einschließlich der pandemischen Erreger, gehören zu den Subtypen mit den Hämagglutininen H1, H2 oder H3.

Im Jahr 1997 trat erneut in Honkong ein aviärer Influenza-Stamm des Typs H5N1 auf. Dieser Virus, heute bekannt unter dem Namen Vogelgrippe, breitete sich zunächst in Geflügelfarmen aus, ging dann aber auch auf den Menschen über [7]. Bis zum jetzigen

1 Einleitung

Zeitpunkt sind der WHO weltweit 516 Fälle bekannt, darunter 306 Todesfälle.¹ Die hochpathogenen Viren der klassischen Geflügelpest („highly pathogenic avian influenza virus“, HPAIV), die 1955 erstmals von W. Schäfer als Influenzaviren erkannt wurden [8], gehören alle zu den Subtypen H5 und H7. Im Unterschied zu den übrigen Subtypen sind die Infektionen, die durch diese Viren ausgelöst werden, nicht auf den Respirationstrakt begrenzt, sondern breiten sich auf alle Organe des Körpers aus [9]. Diese systemische Infektion ist Ursache der hohen Sterblichkeit bei Vögeln und Menschen. Obwohl es bisher durch die aviären Subtypen H5 und H7 des Influenzavirus noch zu keiner Pandemie gekommen ist, wird befürchtet, dass sich durch eine Koinfektion mit anderen Subtypen hochpathogene, pandemische Grippeviren entwickeln [3]. Dies könnte in einem geeigneten Wirt geschehen, z. B. in Schweinen, Vögeln oder sogar dem Menschen.

Die beste Methode, um der Grippe vorzubeugen, ist bis heute die Impfung. Da das Influenzavirus zu häufiger Mutation neigt [10], müssen die Viren, die für die saisonale Grippe verantwortlich sind, jedes Jahr neu isoliert werden. Die Vorbereitung und Produktion des Impfstoffes benötigt im Anschluss ungefähr sechs Monate und ist mit einem enormen Aufwand verbunden. Ähnliches gilt auch für die Entwicklung pandemischer Impfstoffe. Bei einem plötzlichen Ausbruch einer Pandemie steht demnach zunächst kein Impfstoff zur Verfügung, um die Ausbreitung des Virus einzudämmen. Diese Situation war beim Ausbruch der Schweinegrippe im Jahr 2009 zu beobachten.

Für die akute Behandlung von Grippefällen sind in Deutschland bisher nur wenige Arzneistoffe zugelassen. Dies sind sowohl die Neuraminidasehemmer Oseltamivir (Tamiflu®, Roche) und Zanamivir (Relenza®, GlaxoSmithKline) als auch die nur noch selten gegen Influenza-A-Viren verwendeten M2-Protonenkanalinhibitoren Amantadin und Rimantadin. Allerdings sind diese Verbindungen nur wirksam, wenn sie kurze Zeit nach der Infektion eingesetzt werden und die Viren noch keine Resistenzen entwickelt haben. Gegen den oral wirksamen Neuraminidasehemmer Oseltamivir zeigten sich bereits 2007 einige Resistenzen bei Influenzaviren, die durch Mutationen oder Reassortierung verursacht wurden [11]. In der Saison 2007/08 traten vermehrt Viren des Typs H1N1 mit einer Mutation der Neuraminidase (H275Y) auf, die eine Resistenz gegen Oseltamivir zur Folge hat. Ein Jahr später waren bereits über 90 % aller getesteten H1N1-Viren resistent [12–15]. Die Mutation tritt auch bei dem pandemischen H1N1-Virus auf, jedoch eher selten [16]. Allerdings zeigten alle untersuchten Viren dieses Typs Resistenzen gegenüber den M2-Protonenkanalinhibitoren [17].

¹Daten vom 05.01.2011, http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/en/

Die zunehmende Ausbreitung von Resistenzen gegen bestehende Medikamente erfordert die Entwicklung neuer Virostatika, insbesondere von solchen mit einem breiten Wirkspektrum. Erste Versuche zur Anwendung von Kombinationstherapien haben vielversprechende Ergebnisse bei der Behandlung von Grippeinfektionen gezeigt [17]. Ein weiterer Vorteil dieser Art von Behandlung liegt wahrscheinlich darin, dass die Bildung von Resistenzen weitestgehend vermieden wird. Eine andere Möglichkeit, dem Problem der Resistenzbildung zu entgegnen, ist die Entwicklung von Wirkstoffen, die nicht an viralen Zielstrukturen angreifen, sondern wirtseigene Enzyme oder Abwehrmechanismen hemmen.

1.2 Hemmung der Virusausbreitung

1.2.1 Vermehrungszyklus

Der Vermehrungszyklus der Influenzaviren (siehe Abbildung [1.1 auf der nächsten Seite](#)) beginnt mit der Bindung der Virionen an sialinsäurehaltige Rezeptoren auf der Oberfläche bronchialer Wirtsepithelzellen, vermittelt über das Oberflächenprotein Hämagglutinin (HA) [18]. Nach der Anbindung wird das Virus durch Endozytose in die Zelle aufgenommen, in der Folge nimmt durch die Wirkung spezieller Protonenpumpen in der Endosomenmembran (V-ATPasen) während der Reifung der Endosomen der pH-Wert im Lumen ab [20]. Dadurch wird ein irreversibler Konformationswechsel am HA induziert. Voraussetzung dafür ist jedoch, dass das HA im vorangegangenen Vermehrungszyklus durch eine Wirtsprotease in die Untereinheiten HA1 und HA2 gespalten wurde. Die helikalen HA2-Domänen des als Homotrimer vorliegenden HA-Komplexes werden freigesetzt und binden mit ihrem hydrophoben N-terminalen Bereich an die Endosomenmembran. Auf diese Weise wird die Fusion mit der Virushülle eingeleitet (siehe Abb. [1.2 auf Seite 5](#)) und es kommt zur Bildung einer Fusionspore [18].

In der Folge wird die Virusmembran geöffnet und die viralen RNA-Segmente und damit assoziierte Proteine können ins Zytosol der Zelle freigesetzt werden [19]. Im Zellkern findet die Transkription der Negativstrang-RNA in eine mRNA statt. Außerdem wird dort die neue, virale Negativstrang-RNA durch Replikation gebildet. Die mRNA wird in das Zytosol transportiert und dort bzw. am rauen ER translatiert. Virale Proteine und RNA werden an die Zelloberfläche transportiert, wo dann aus den einzelnen Komponenten das neue Virion zusammengebaut wird. Durch Knospung schnürt sich der Viruspartikel von der Zelle ab, bleibt aber zunächst über die HA-vermittelte Bindung an die Sialinsäuren mit der Zelle verbunden. Durch die Aktivität der Neuraminidase werden die Sialinsäuren auf

1 Einleitung

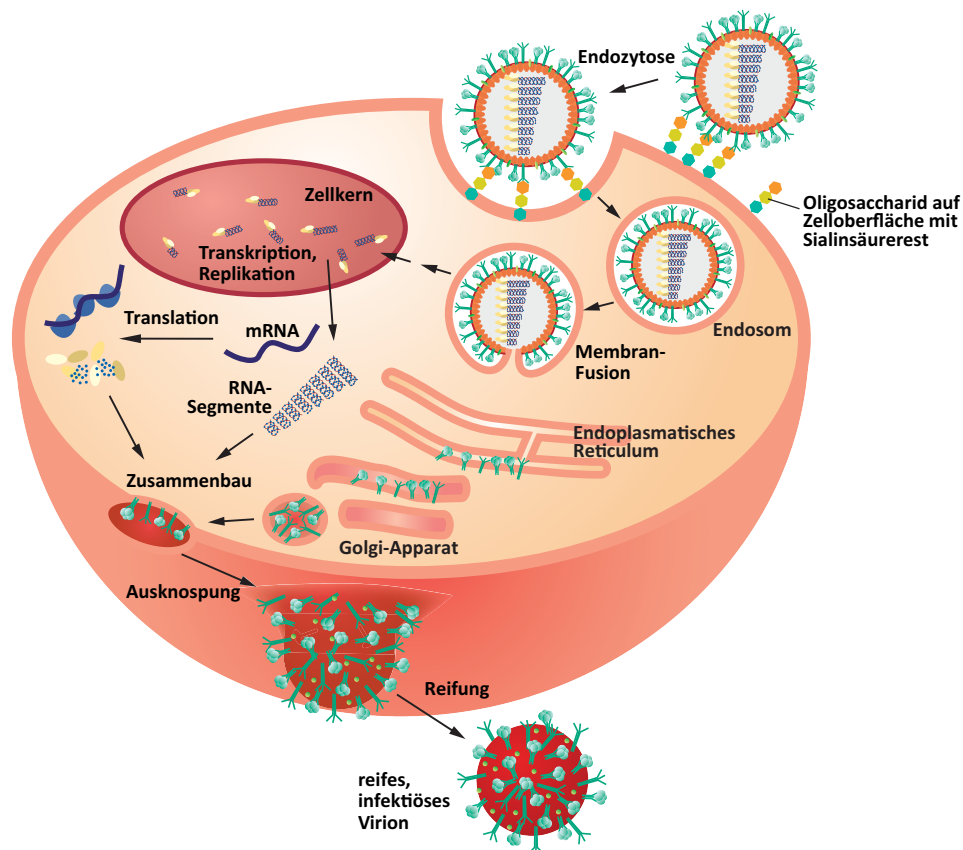


Abbildung 1.1: Vermehrungszyklus des Influenzavirus. Der Zelleintritt erfolgt durch Bindung an sialinsäurehaltige Glykoproteine und darauffolgende Endozytose. Anschließend fusioniert die Virusmembran mit der Endosomenmembran und der Virusinhalt wird ins Zytosol abgegeben. Im Zellkern findet die Transkription und Replikation statt, die mRNA wird dann im Zytosol translatiert. Nach Transport sämtlicher Virusbestandteile an die Wirtsmembran erfolgt dort der Zusammenbau des neuen Virions, welches im Anschluss in das extrazelluläre Medium freigesetzt wird (aus: [19]).

der Zelloberfläche abgespalten und so das Virion in das extrazelluläre Medium freigesetzt. Die Sialinsäuren diffundieren später aufgrund der schwachen Bindung zum HA wieder ab.

1.2.2 Angriffspunkte zur Hemmung der Virusvermehrung

Die Ausbreitung der Viren kann auf verschiedene Art und Weise eingegrenzt werden. So existieren bereits Wirkstoffe, die z. B. die Bindung der Virionen an die Wirtszellen hemmen, indem sie die Sialinsäuren imitieren und stattdessen an das Hämagglutinin an der Oberfläche der Influenzaviren binden [22]. Daneben können nach erfolgter Endozytose die wirtseigenen V-ATPasen inhibiert werden, die für den Einstrom von Protonen in die Endosomen verantwortlich sind [23]. Dadurch wird der Konformationswechsel der gespaltenen HA-Trimere verhindert; die Endosomenmembran kann nicht mit der Virusmembran

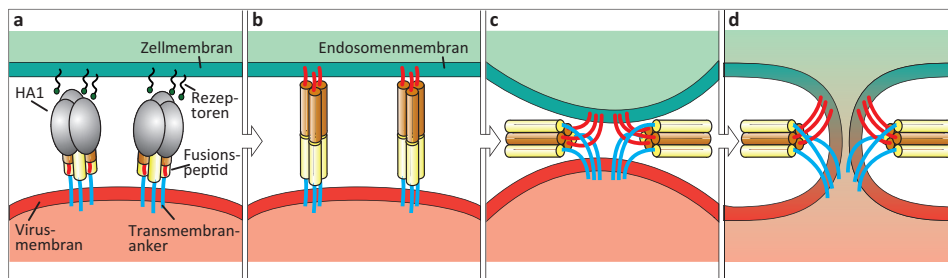


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Virusanbindung und der HA-vermittelten Fusion der Virushülle mit der Endosomenmembran. (a) HA-Trimere sind in der Virushülle lokalisiert und binden an sialinsäurehaltige Rezeptoren der Wirtsmembran. (b) Nach erfolgter Endozytose diffundiert das bereits im vorangegangenen Vermehrungszyklus abgespaltene HA1 im leicht sauren Milieu ab, bleibt aber kovalent über eine Disulfidbrücke mit HA2 verbunden (nicht mehr dargestellt). Die über eine flexible Region verbundenen Helices (gelbe und braune Zylinder) gehen einen Konformationswechsel ein, so dass das Fusionspeptid einen Kontakt mit der Endosomenmembran herstellen kann. (c) Durch einen erneuten Konformationswechsel lagern sich die Helices wieder zusammen, dadurch werden die Membranen in unmittelbare Nähe gebracht. (d) Durch den direkten Kontakt der Membranen bildet sich eine Fusionspore (angepasst aus [21]).

verschmelzen. Die Hemmung des M2-Ionenkanals in der Virushülle durch Amantadin und Rimantadin unterbindet den Einstrom von Protonen in das Virion. Ein niedriger pH-Wert im Inneren ist Voraussetzung für die Ablösung der viralen Ribonukleoproteine (vRNP) von dem M1-Matrixprotein [24]. Ohne diesen Prozess können die vRNPs nicht mehr freigesetzt werden und in den Zellkern gelangen, um dort transkribiert und repliziert zu werden.

Im weiteren Verlauf des Vermehrungszyklus existieren noch mehrere mögliche Angriffspunkte, um die Virusausbreitung einzudämmen, beispielsweise die Hemmung der viralen Polymerase oder der Einsatz von Neuraminidaseinhibitoren, um die Ablösung neu synthetisierter Virionen von der Zellmembran zu unterbinden (für einen Review, siehe [24]).

Eine Möglichkeit zur Beeinflussung der Virusvermehrung ist auch die Hemmung der wirtseigenen Proteasen, die für die Spaltung des HA-Vorläuferproteins verantwortlich sind. In Abhängigkeit der verschiedenen Virustypen erfolgt diese Spaltung durch unterschiedliche Proteasen. Während die Subtypen H1, H2 und H3 der saisonalen Grippeviren durch trypsinartige Serinproteasen aktiviert werden, erfolgt die Spaltung der Hämagglutinin-Subtypen H5 und H7 hochpathogener Grippeviren durch Proteasen aus der Familie der Proproteinkonvertasen. Das Ziel der vorliegenden Dissertation bestand deshalb in der Entwicklung neuartiger Inhibitoren dieser Proproteinkonvertasen als potentielle Wirkstoffe für die Behandlung von Infektionen mit hochpathogenen Influenzaviren.

1 Einleitung

1.2.3 Hämagglutinin-Spaltung

Das Hämagglutinin ist ein Glykoprotein und wird als Vorläuferprotein (HA0) synthetisiert. Durch die Spaltung des HA0 an einer basischen Erkennungssequenz werden die Untereinheiten HA1 und HA2 gebildet [25] und das Hämagglutinin in die aktive Form überführt. Diese Prozessierung ist essentiell für die Infektiosität von Influenzaviren [26]. Nach der Spaltung bleiben die beiden Untereinheiten weiterhin kovalent über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden [27].

Die Art der Erkennungssequenz bzw. der Spaltstelle in den HA0-Molekülen beeinflusst die Pathogenität der Viren, je nachdem, welche Proteasen in der Lage sind, das HA0-Molekül zu prozessieren. In den hochpathogenen Vogelgrippe-Viren der Subtypen H5 und H7 liegen multibasische Spaltstellen mit der Konsensussequenz . . . -Arg-X-Lys/Arg-Arg↓-X- . . . vor, die durch ubiquitär vorkommende Proproteinkonvertasen, wie Furin oder PC5/6, erkannt werden [28–30]. Dadurch kann sich das Virus in allen Geweben ausbreiten und verursacht systemische Infektionen [31]. Die anderen humanpathogenen Influenza-A-Viren (H1, H2 und H3), inklusive der pandemischen und epidemischen Stämme, besitzen dagegen ein einzelnes Arginin an der Spaltstelle. Diese wird durch trypsinartige Serinproteasen des Wirts prozessiert.

In den letzten Jahren wurden in der AG Garten² mehrere Proteasen identifiziert, die diese Spaltung ermöglichen. Beispiele hierfür sind die HAT („human airway trypsin-like protease“), die TMPRSS2 („transmembrane protease, serine S1 family member 2“) [32] und möglicherweise auch die TMPRSS4 [33]. Im Gegensatz zu den Proproteinkonvertasen werden die genannten trypsinartigen Proteasen nicht ubiquitär exprimiert. Dadurch bleibt die Virusausbreitung im Laufe einer Infektion auf bestimmte Organe, vor allem dem oberen Bereich des Respirationstraktes, beschränkt und normalerweise entwickelt sich keine schwerwiegende, systemische Infektion [34]. Im Rahmen dieser Dissertation wurde sich auf die Entwicklung von Inhibitoren der Proproteinkonvertasen beschränkt, die daher im folgenden Abschnitt beschrieben werden.

1.3 Proproteinkonvertasen

Das Genom des Menschen besteht aus ca. 20 000–25 000 Genen [35], von denen ungefähr 690 (2–4%) für proteolytische Enzyme kodieren [36]. Die Klassifizierung dieser Enzyme basiert auf ihrem Katalysemechanismus und den darin involvierten Aminosäureresten. Im

²Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg.

1.3 Proproteinkonvertasen

Menschen existieren fünf Klassen von Proteasen: Serin-, Cystein-, Aspartat-, Threonin- und Metalloproteasen. Eine weitere Klasse bilden die Glutamyloproteasen, die jedoch noch nicht in Säugetieren gefunden wurden [37].

Die Klasse der Serinproteasen unterteilt sich in mehrere Familien. Die trypsinartigen Proteasen gehören zur Familie S1, während die Proproteinkonvertasen zu den subtilisinartigen Proteasen der Familie S8 gerechnet werden (Subtilisin Carlsberg, *Bacillus licheniformis* [36]). Zur Familie S8 gehören zwei Unterfamilien, wobei sich eine von der Kexin-Struktur aus *Saccharomyces cerevisiae* ableitet (S8B). Zu dieser Unterfamilie zählen die bisher entdeckten sieben, calciumabhängigen Proproteinkonvertasen, PC1/3, PC2, Furin, PC4, PC5/6, PACE4 und PC7 (PCs, siehe auch Tabelle 1.1) [38]. Diese PCs spalten Peptidsequenzen endoproteolytisch hinter gepaart basischen Aminosäuren (furinartige PCs), während die nah verwandten PCs SKI-1 und PCSK9 der Unterfamilie S8A hinter hydrophoben Resten ihre Substrate hydrolysieren und in den Fettsäure- bzw. Cholesterinmetabolismus involviert sind [38].

Tabelle 1.1: Proproteinkonvertasen [38]

Funktion	Gen	Name ^a	Lokalisation	Aktivierung ^b
Proteinaktivierung, Spaltung nach basischen Aminosäuren	<i>PCSK1</i>	PC1/3 , PC1, PC3	DCG ^c	Sekr. Vesikel
	<i>PCSK2</i>	PC2 , SPC2	DCG	Sekr. Vesikel
	<i>PCSK3</i>	Furin , PACE, PC1	Typ I TM ^d	TGN/Zelloberfläche
	<i>PCSK4</i>	PC4 , SPC5	extrazellulär	
	<i>PCSK5</i>	PC5/6 A ^e , PC5	DCG/extrazellulär	TGN/Zelloberfläche
		PC5/6 B ^e , PC6	Typ I TM	TGN/Zelloberfläche
	<i>PCSK6</i>	PACE4 , SPC4	extrazellulär	TGN/Zelloberfläche
Fettsäure/Cholesterinmetabolismus	<i>PCSK7</i>	PC7 , PC8, LPC	Typ I TM	TGN
	<i>PCSK8</i>	S1P, SKI-1	Typ I TM	cis Golgi
	<i>PCSK9</i>	PCSK9, NARC-1	extrazellulär	keine ^f

^a Offizielle Bezeichnung nach [39] fettgedruckt ^b Ort der Aktivierung der Proproteinkonvertase

^c DCG: „dense core granules“ ^d Transmembran ^e Isoformen A und B, alternatives Splicing

^f PCSK9 wird als inaktiver Komplex mit seinem Prosegment in das extrazelluläre Medium abgegeben

Die PCs sind in vielfältigen physiologischen Prozessen im Stoffwechsel des Menschen beteiligt [39]. Durch die endoproteolytische Spaltung von zahlreichen Vorläuferproteinen im sekretorischen Weg der Zelle sind PCs in der Lage, essenzielle, bioaktive Peptide und Proteine zu aktivieren, z. B. Hormone und Neuropeptide, Wachstumsfaktoren und Differenzierungsfaktoren, Proteine der extrazellulären Matrix und des Plasmas, Enzyme und Rezeptoren, aber auch bakterielle Toxine und virale Proteine [38–40]. Die zentra-

1 Einleitung

Die Bedeutung dieser Proteasen zeigt sich auch anhand verschiedener Knockout-Studien (Tabelle 1.2), die zu den einzelnen, furinartigen PCs durchgeführt wurden [39, 41, 42].

Tabelle 1.2: Knockout-Phenotypen der furinartigen Propeptidkonvertasen [39, 41, 42].

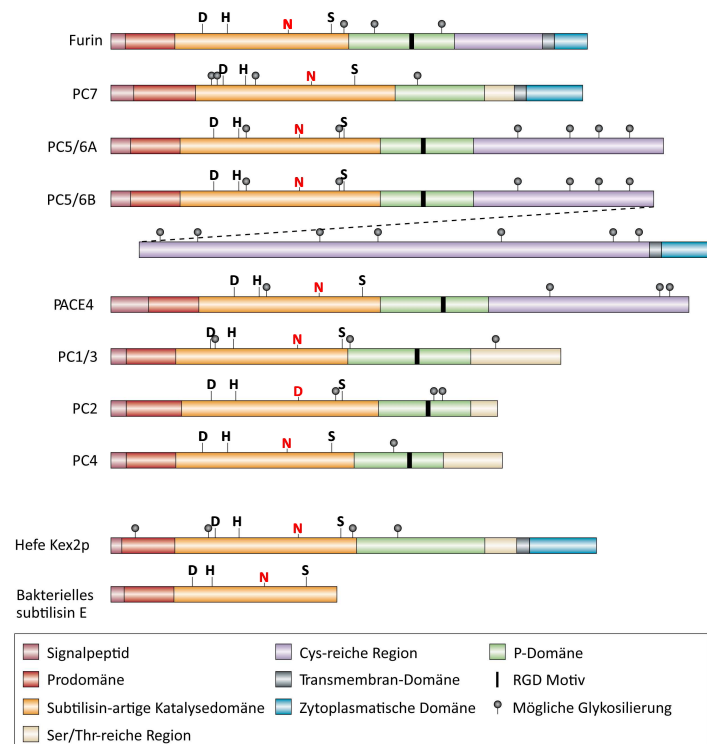
PC	Verbreitung im Organismus	Knockout Phenotyp
PC1/3	neuroendokrines System	schwere Wachstumsstörungen, mangelhafte GHRH ^a und POMC ^b Prozessierung, Hyperproinsulinämie
PC2	neuroendokrines System	Hypoglykämie, Proinsulinämie, Glukagonmangel, gestörte Opioidpeptid-Prozessierung
Furin	ubiquitär	embryonaler Tod nach 10,5 Tagen, beeinträchtigte axiale Rotation
PC4	testikuläre/ovariale Keimzellen	männlich: Unfruchtbarkeit, weiblich: milde Unfruchtbarkeit
PC5/6A PC5/6A	ubiquitär	embryonaler Tod nach Implantation (4,5–6,5 Tage), multiple Missbildungen
PACE4	ubiquitär	embryonaler Tod nach 15,5 Tagen, cranofaciale- und ZNS-Defekte
PC7	ubiquitär	lebensfähig, thymische Defekte

^a GHRH: „growth hormone releasing hormone“ ^b POMC: Proopiomelanocortin

Die physiologischen Funktionen der einzelnen PCs sind teilweise redundant, viele Substrate werden sehr wahrscheinlich von mehreren Konvertasen prozessiert [43]. Hinweise darauf wurden auch bei erwachsenen Mäusen mit einem gewebespezifischen Knockout von Furin in der Leber gefunden. Die Tiere zeigten keine morphologischen Anomalien, außer der fehlenden Furinproduktion; die Analyse einiger sonst von Furin prozessierter Substrate, wie des Insulin-Rezeptors oder des Albumins zeigten keine Auffälligkeiten [44].

Eine Erklärung für diese Redundanz ist möglicherweise die hohe Sequenzhomologie innerhalb der subtilisinartigen, katalytischen Domäne der furinartigen PCs (siehe Abb. 1.3). N-terminal von der katalytischen Domäne befindet sich bei allen PCs eine Propeptidsequenz, während sich C-terminal eine ebenfalls hochkonservierte P-Domäne anschließt. Diese ist ca. 150 Aminosäuren lang und ist primär für die korrekte Faltung der katalytischen Domäne verantwortlich und ermöglicht die Ausbildung einer Calcium-Bindungsstelle [45, 46]. In dieser Domäne befindet sich weiterhin ein konserviertes RGD-Motiv. Für die Konvertase PC1 wurde gezeigt, dass dieses Motiv wichtig für die korrekte Faltung und Aktivierung des Zymogens im ER, sowie die korrekte Sortierung in die sekretorischen Vesikel ist [47, 48]. Die am geringsten konservierten, carboxyterminalen

Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Domänenstruktur der Proproteinkonvertasen. Gezeigt sind die sieben, furinartigen PCs, sowie Kex2 aus Hefe und das bakterielle Subtilisin E, welchem die konservierte P-Domäne fehlt. PC5/6 wird als Isoform A und B durch alternatives Splicing exprimiert, die gestrichelte Linie stellt die Fortsetzung der PC5/6B dar. Die Buchstaben D, H und S markieren die Aminosäuren der katalytischen Triade, wohingegen das rote N (D bei PC2) die Position der Oxyanionentasche kennzeichnet. Abbildung angepasst aus [41].



Regionen der Aminosäuresequenzen kontrollieren die intrazelluläre Lokalisation und den Transport der Enzyme auf dem sekretorischen Weg [49].

1.4 Furin

Im Jahr 1986 wurde ein „open reading frame“ in der FUR-Region („fes/fps-upstream region“) entdeckt, welcher Homologien zum Gen des bekannten Kex2 aufwies [50]. Das Produkt dieses Genes, das FUR-Insert, wurde in den darauffolgenden Jahren intensiv untersucht und als Furin benannt [51,52]. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist Furin die am besten untersuchte Proproteinkonvertase und stellt den Prototyp dieser Proteasefamilie dar.

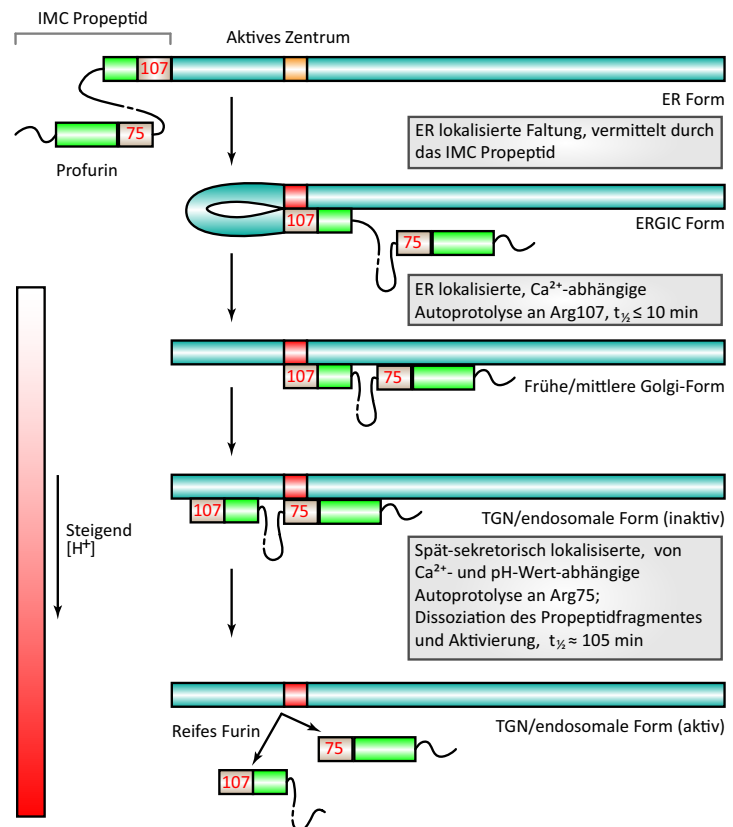
Das Enzym wird ubiquitär als 794 Aminosäuren langes Typ-I-Transmembranprotein exprimiert, welches in allen Wirbeltieren und in vielen wirbellosen Tieren zu finden ist [53,54]. In Homologie zu den restlichen Vertretern dieser Familie ist die katalytische Triade des aktiven Zentrums (Asp153, His194 und Ser368) konserviert. Furin ist strikt calciumabhängig und verliert seine Aktivität in calciumfreiem Puffer.

1 Einleitung

1.4.1 Autokatalytische Aktivierung des Furins

Furin wird mit einer 83 Aminosäuren langen Prodomäne am ER synthetisiert. Diese Domäne fungiert dort unter neutralen pH-Bedingungen als intramolekulares Chaperon und unterstützt die korrekte Faltung der katalytischen Proteasedomäne [55]. Die Aktivierung des Furins verläuft über einen mehrstufigen Prozess, der durch autokatalytische Spaltung in der Prodomäne zum aktiven Enzym führt (Abb. 1.4).

Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der autokatalytischen Aktivierung des Furins. Nach Translokation ins ER und Abspaltung der Signalsequenz fungiert das Propeptid als intramolekulares Chaperon (IMC) zur Unterstützung der korrekten Faltung der katalytischen Proteasedomäne (orange zu rot, ERGIC: „endoplasmatic reticulum–Golgi intermediate compartment“). Es folgt eine autokatalytische Spaltung des Propeptides an Arg107 im frühen Golgi-Komplex. Die Prodomäne bleibt an Furin gebunden und fungiert als effektiver Autoinhibitor auf dem sekretorischen Weg. Im relativ sauren Milieu des TGN wird das Propeptid erneut autoproteolytisch an Arg75 gespalten, gefolgt von schneller Dissoziation der Fragmente. Abbildung angepasst aus [41] und [55].



Dabei wird zunächst in einem schnellen Schritt ($t_{1/2} \leq 10$ min) im relativ neutralen Medium des ER an Arg107 die Prodomäne abgespalten, bleibt aber weiterhin als Inhibitor am katalytischen Zentrum gebunden. Im TGN bzw. dem endosomalen System herrschen mild-azide Bedingungen, die zu einer zweiten Spaltung in der Propeptidsequenz an Arg75 führen, gefolgt von einer schnellen Dissoziation der Fragmente, was letztendlich zu aktivem Furin führt.

1.4.2 Intrazelluläre Lokalisation des Furins

Nach der Bildung des aktiven Enzyms ist Furin im TGN lokalisiert. Von dort aus wird es über den sekretorischen Weg durch endosomale Kompartimente zur Zelloberfläche und

wieder zurück zum TGN transportiert [56]. Die Lokalisation des Furins wird dabei durch den 56 Aminosäuren langen, C-terminalen Teil der Sequenz im Cytoplasma kontrolliert. Ein hydrophobes Motiv führt zur Sekretion des Furins aus dem TGN durch Bindung an Adapter-Proteine, während ein saures Motiv durch Casein-Kinase 2 phosphoryliert werden kann, wodurch Furin aus Endosomen zurückgewonnen wird [57]. Die an der Regulation der Furin-Lokalisation beteiligten Proteine sind in Abbildung 1.5 gezeigt.

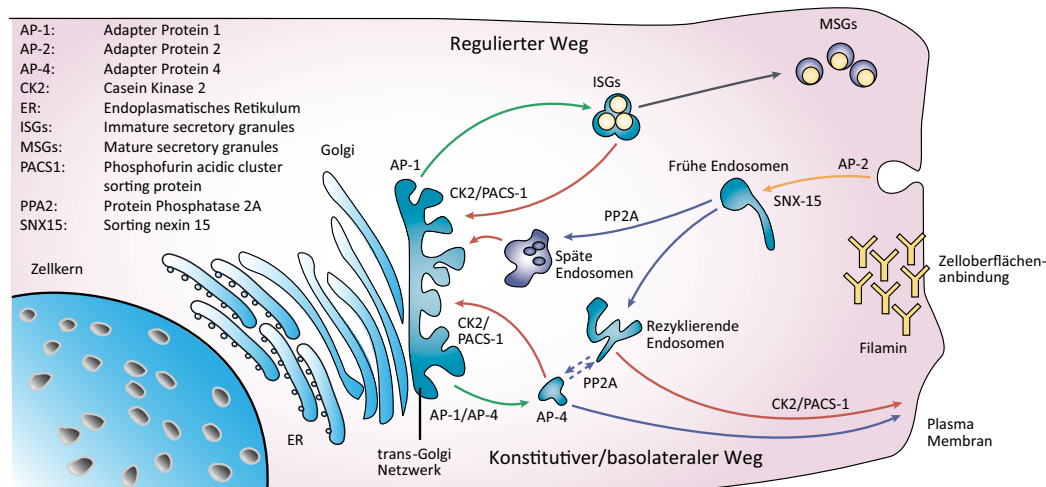


Abbildung 1.5: Modell der Furinlokalisierung in der Zelle. Die Sortierung des Furins ausgehend vom TGN beginnt mit Bindung von hydrophoben Signalsequenzen des C-Terminus an AP-1 oder durch Bindung an AP-4. In endokrinen/neuroendokrinen Zellen wird Furin durch AP-1 in ISGs verpackt, welche später zu MSGs reifen. PACS-1 verbindet CK2-phosphoryliertes Furin mit AP-1, um Furin von ISGs oder aus Endosomen zum TGN zurückzutransportieren. An der Zelloberfläche werden Furinmoleküle über ein Protein des Cytoskeletts (Filamin) an die Membran gebunden. Die Clathrin/Dynamin-abhängige Internalisierung des Furins beginnt mit Bindung an AP-2; SNX-15 moduliert dabei die Sortierung. In frühen Endosomen wird Furin dephosphoryliert (PP2A) und über ein spätes Endosom zurück zum TGN transportiert, während CK2-phosphoryliertes Furin über einen PACS-1-abhängigen Schritt zurück zur Plasmamembran gelangt. Der TGN- und der periphere Transportzyklus sind prinzipiell spiegelbildlich zueinander aufgebaut. Abbildung angepasst aus [41].

Letztendlich wird Furin im sekretorischen Weg in einer „steady-state“-Position gehalten. Durch den immer wiederkehrenden Transport vom TGN über die einzelnen Kompartimente zur Plasmamembran und wieder zurück ist es Furin möglich, verschiedenste Proproteine zu aktivieren, die diesen Weg durchlaufen. Aber auch Toxine oder Virusproteine, die in diesen Kompartimenten zu finden sind oder sich auf der Zelloberfläche anheften, stellen damit mögliche Substrate für Furin dar.

1.4.3 Furinkatalysierte Prozesse in der Zelle

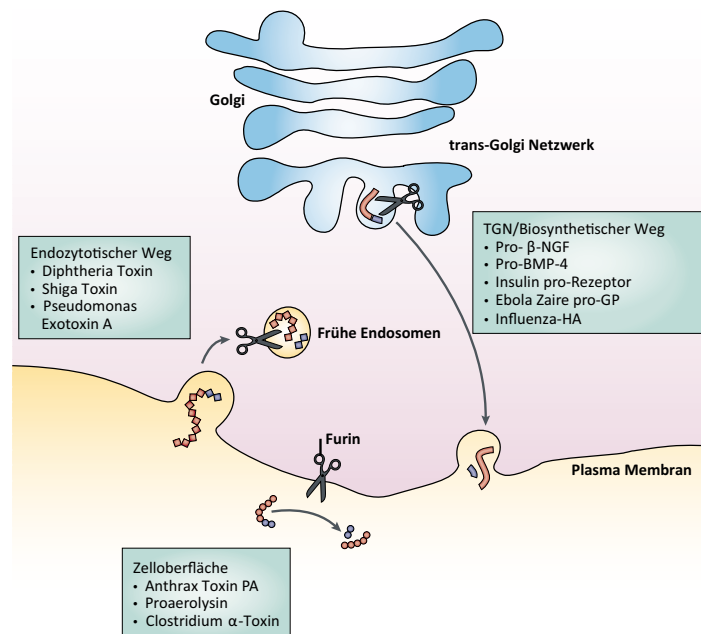
Furin katalysiert die Reifung einer erstaunlich großen Zahl von Proprotein-Substraten [58, 59] und ist darum auch in viele wichtige, physiologische Prozesse involviert. Insbesondere während der Embryonalentwicklung ist Furin von essenzieller Bedeutung. Die Inaktivierung des *fur*-Genes in Mäusen hat gezeigt, dass Embryonen bereits nach 11,5 Tagen sterben, die Ursache dafür liegt in einer Fehlbildung des Herzens und in einer ausbleibenden axialen Rotation [60].

Verantwortlich für das Wachstum und die Differenzierung des Gewebes in diesem Entwicklungsstadium sind spezielle Faktoren, z. B. TGF β 1 („tissue growth factor β 1“) und weitere Proteine dieser Art, die von Furin prozessiert werden [61]. Dazu gehört die Aktivierung von β -NGF („nerve growth factor“ [56]), von Knochen-Morphogenese-Faktoren (BMP-4, möglicherweise auch von BMP-7 und BMP-5, „bone morphogenic protein/factor“, [62, 63]) und von verschiedenen Integrinen, wie α 4-Integrin, welches zusammen mit dem vaskulären Zell-Adhäsionsmolekül VCAM-1 Zell-Zell-Verbindungen im embryonalen Entwicklungsstadium vermittelt [64, 65]. Des Weiteren werden auch Proteine aus Signaltransduktionskaskaden durch Furin prozessiert. Dazu gehört der NOTCH-Rezeptor, der in die Zell-Zell-Kommunikation involviert ist [66] sowie Ectodysplasin-A, welches als Typ-II-Transmembranprotein die Ausbildung verschiedener Epithelgewebe (inklusive Haare, Zähne und Schweißdrüsen) kontrolliert [67].

Furin kann in der Zelle durch gezielte Spaltung nicht nur normale physiologische Prozesse steuern, sondern wird auch mit verschiedenen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht. In Tumorgeweben konnte eine gesteigerte Invasivität und Malignität auf die erhöhte Produktion von Proprotein-Konvertasen zurückgeführt werden. Dies ist möglicherweise durch die Aktivierung von Metalloproteasen, von Angiogenese- und Wachstumsfaktoren oder deren Rezeptoren zurückzuführen [68–71].

Die Funktion der PCs bei der Regulation von Tumorwachstum scheint aber eher komplex zu sein, da auch von der Aktivierung von Proteinen mit Tumorsuppressor-Funktionen berichtet wurde [72]. Beispielsweise aktiviert Furin Cadherine, die die Zell-Zell-Adhäsion vermitteln. Wird die Biosynthese dieser Proteine beeinflusst, können Tumorzellen leichter von ihrem Zellverbund losgelöst werden und Metastasen bilden. Durch die Aktivierung von α - β - und γ -Sekretasen, die für die Bildung der Amyloidpeptide verantwortlich sind, ist Furin möglicherweise auch bei der Entwicklung der Alzheimer-Krankheit beteiligt [73]. Die endoproteolytische Spaltung von membrangebundenen MT1-Metalloproteasen in Makrophagen durch PCs ist ein wichtiger Faktor für die Stabilität von Plaques, deren gehäuftes Auftreten zu Arteriosklerose führt [74].

Abbildung 1.6: Aktivierung einiger Proproteine durch Furin im TGN oder endosomalen System. Furin, symbolisiert als Schere, spaltet im TGN oder dem Biosyntheseweg viele Substrate, z. B. pro- β NGF („nerve growth factor“), pro-BMP-4 („bone morphogenic factor“), den Insulin-pro-Rezeptor, Ebola Zaire pro-Glykoprotein (pro-GP) und Influenza-Hämagglutinine (HA). An der Zelloberfläche wird das Anthrax-Toxin „protective antigen“ (PA), Proaerolysin und *Clostridium septicum* α -Toxin gespalten. Unter mild-aziden Bedingungen in frühen Endosomen aktiviert Furin u.a. das Diphtherie-Toxin und Shiga-like Toxin-1 sowie *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A. Abbildung angepasst aus [41].



Furin kann aber nicht nur zelleigene Proproteine oder Prohormone aktivieren, sondern auch eine Reihe von bakteriellen Toxinen. Beispiele hierfür sind das Anthrax-Toxin aus *Bacillus anthracis*, *Pseudomonas aeruginosa*-Exotoxin, das Shiga-like Toxin-1 oder das Diphtherie-Toxin [41]. In welchen Kompartimenten des sekretorischen Weges Furin einige der Proteine oder Toxine prozessiert, ist in Abbildung 1.6 gezeigt.

Neben den Hämagglutininen H5 und H7 der aviären Influenza können auch viele andere virale Proteine durch Furin prozessiert werden. Dazu gehört das Oberflächenprotein gp160 von HIV, welches in gp120 und gp41 gespalten wird. Diese Spaltung ist notwendig für die Virulenz von HIV [75]. Ebenso werden die Glykoproteine von Masern-, Ebola- und Marburg-Viren durch Spaltung an multibasischen Erkennungssequenzen aktiviert. Für die Spaltung durch Furin kommen noch viele weitere Erkennungssequenzen aus verschiedenen Viren in Frage. Darunter befinden sich z. B. der Erreger des Dengue-Fiebers, das West-Nil-Virus oder das Epstein-Barr-Virus [59].

Aufgrund der vielfältigen Erkrankungen, die durch furinvermittelte Aktivierung diverser Substrate entstehen können, ist dieses Enzym ein attraktives Ziel für die Wirkstoffentwicklung zur Behandlung dieser Erkrankungen.

1 Einleitung

1.4.4 Furininhibitoren

Wie bereits erwähnt, werden von Furin zahlreiche Proteine aktiviert, die zum Ausbruch von Erkrankungen führen oder für deren Verlauf maßgeblich verantwortlich sind. Deshalb wurden von verschiedenen Gruppen Furininhibitoren entwickelt, um sie perspektivisch als Wirkstoffe für die Behandlung dieser Erkrankungen einzusetzen oder um sie für biochemische Untersuchungen mit Furin zu verwenden.

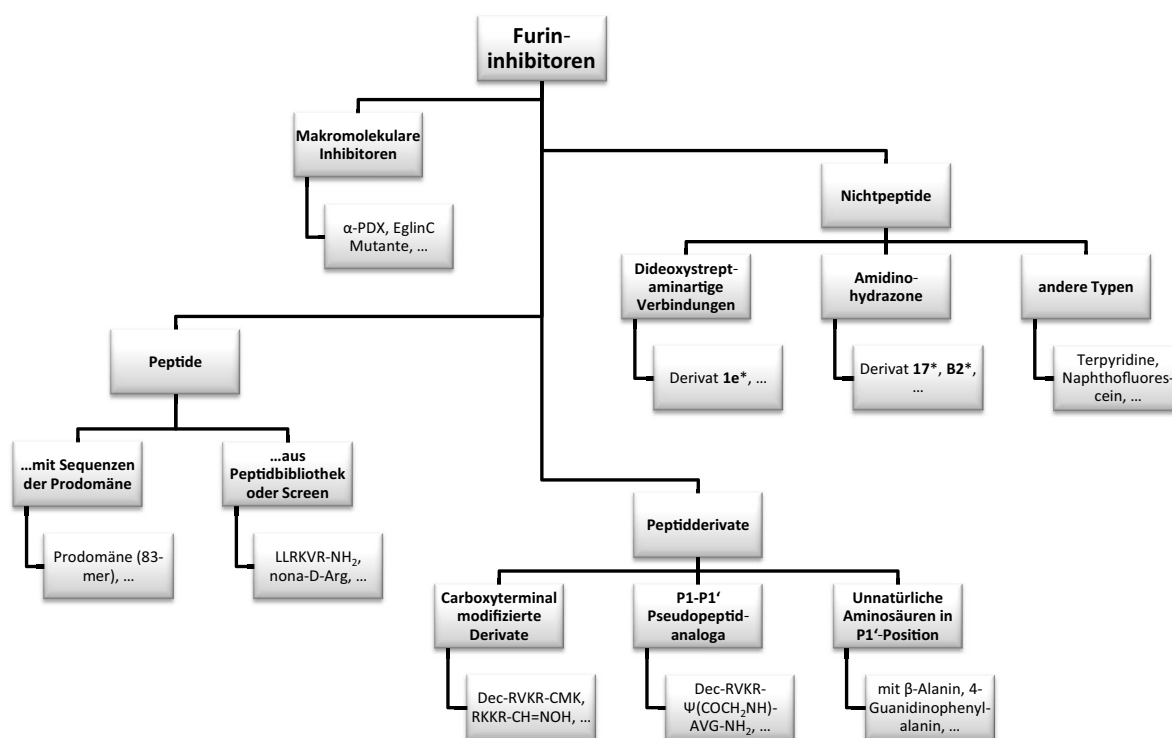


Abbildung 1.7: Einteilung von Furininhibitoren. Die mit einem Stern gekennzeichneten Verbindungen sind in Tabelle 1.3 aufgeführt bzw. in Abbildung 1.8 gezeigt.

Die Inhibitoren der Proproteinkonvertasen allgemein und für Furin im Speziellen können nach ihren Strukturtypen eingeteilt werden (Abb. 1.7). Die Strukturen mit den höchsten Molekulargewichten leiten sich von natürlichen Proteasehemmstoffen oder der Prodomäne des Furins ab. Dazu gehören Sequenzen, die gezielt mutiert wurden, um Furin effektiv hemmen zu können. Das α 1-Antitrypsin Portland mit einem K_i -Wert von 1,4 nM gehört zu diesen Verbindungen, die biochemisch synthetisiert wurden [76]. Auch eine Eglin-C- [77] oder die „Turkey ovomucoid third domain“-Mutante [78] gehören zu dieser Art Inhibitoren (Ausgewählte Furininhibitoren sind in Tabelle 1.3 auf Seite 16 mit den bestimmten K_i - oder IC_{50} -Werten zusammengestellt). Als Wirkstoffe sind solche Makromoleküle nicht geeignet. Daher wurden kürzere Peptide entwickelt, die beispielsweise

von der Sequenz der Furinprodomäne ($K_i=154$ nM, [79]) oder von Substraten abgeleitet wurden.

Aus einer Peptidbibliothek konnte im Jahr 2000 ein Hexapeptid-Derivat gefunden werden (LLRVKR-NH₂), welches Furin mit einem K_i -Wert von 800 nM relativ gut hemmt [80]. Ausgehend von dieser Struktur wurden weitere Derivate synthetisiert, von denen sich die poly-L-Arginin-Varianten als besonders wirksam erwiesen. Es wurde beschrieben, dass einige dieser Verbindungen als Substrate durch Furin gespalten werden, wobei auch die Spaltprodukte eine Hemmwirkung besitzen [81]. Der Austausch von L-Arginin durch das D-Derivat führte zu nona-D-Arginin: diese Verbindung war der bis dahin am effektivsten hemmende, reversible Furininhibitor im niedermolekularen Bereich. Diese Peptidderivate mit D-Aminosäuren erwiesen sich als relativ stabil gegen proteolytischen Abbau [81].

Anstelle von reinen Peptid-Sequenzen können auch Peptidmimetika als Inhibitoren eingesetzt werden. Eine Möglichkeit ist der Einbau von ungewöhnlichen Aminosäuren in P1- oder P1'-Position (Nomenklatur nach Schechter und Berger [82]). Beispielsweise wurde Cyclohexylalanin oder β -Alanin in P1'-Position eingebaut [83, 84] oder 4-Guanidinophenylalanin als P1-Rest verwendet [85].

Effektive Inhibitoren können ebenso durch den Ersatz der P1–P1'-Peptidbindung mit einem nicht-spaltbaren Analogon (Pseudopeptidbindung, gekennzeichnet mit Ψ) erhalten werden. Üblicherweise werden dafür Keton-Derivate eingesetzt. Einer der ersten Inhibitoren dieser Art für Furin war das im Jahr 1992 etablierte, decanoylierte Chlormethylketon Dec-RVKR-CMK (Struktur in Abb. 1.10 auf Seite 19, [75]). Dieses substratanaloge Derivat reagiert irreversibel mit dem Enzym (Abb. 1.9b auf Seite 18) und war zu dieser Zeit einer der effektivsten Furininhibitoren. Für die Entwicklung von Wirkstoffen ist die Chlormethylketon-Struktur aber wenig geeignet, da sie oft unspezifisch mit Nucleophilen reagieren kann und deshalb in physiologischer Lösung instabil ist (siehe auch Abschnitt 2.2.4 auf Seite 40). Der Inhibitor wurde aber auf vielfältige Weise für biochemische Tests, unter anderem auch zu Untersuchungen der furinkatalysierten Spaltung von Hämagglutininen eingesetzt [99].

In ersten Arbeiten von Anglikar im Jahr 1995 konnten durch die Einführung verschiedener Ketomethylen-Strukturen anstelle der Peptidbindung sehr potente, reversibel bindende Peptidmimetika synthetisiert werden [91]. In neuerer Zeit wurde eine peptidische Struktur basierend auf der Sequenz der Prodomäne des Furins generiert, bei der zwischen dem P1-Arg- und P1'-Asp eine Enediynyl-Gruppe eingebaut wurde (Abb. 1.8 auf Seite 17, [92]). Mit diesem Inhibitor konnte ein IC_{50} -Wert von 40 nM bestimmt werden. Die Enediynyl-Gruppe soll einen stabilen β -Turn an der Spaltstelle imitieren [92].

1 Einleitung

Tabelle 1.3: Beispiele für Furininhibitoren (es wurden stets die wirksamsten Derivate aus den angegebenen Arbeiten gezeigt). Die mit einem Stern gekennzeichneten Inhibitoren sind in Abbildung 1.8 dargestellt.

Typ ^a	Inhibitor	K _i (nM)	Referenz
M	Eglin C, Variante M2 (RVKR) ^b	1,6	[77, 86]
M	„Turkey ovomucoid third domain“ (A15R, T17K, L18R) ^b	110	[78, 86]
M	α1-Antitrypsin Portland (α1-PDX/hf)	1,4	[76]
P	Furin-Prodomäne, 83-mer	154	[79]
P	DYYHFWHRGVTKRSLSPHRPRHSR	900	[87]
P	DSHAKRHHGYKRKFHEKHHSHRGYRSNYLYDN ^c	1980	[88, 89]
P	DSHAKRHHGYKRKFHEKHHSHRGY ^d	2980	[88, 89]
P	LLRVKR-NH ₂	800	[80]
P	nona-L-Arg	42	[80]
P	nona-D-Arg	1,3	[81]
PM	Dec-RVKR-CMK	irreversibel	[75]
PM	RKKR-CH=NOH	55400	[87, 89]
PM	Cyclo[CGTRVKR-Ψ(CH ₂ NH)-EKRIDRTRSF]	800	[89, 90]
PM	Dec-RVKR-Ψ(COCH ₂ NH)-AVG-NH ₂	3,4	[91]
PM*	Enediynyl-Peptid-Derivat der Furin-Prodomäne	40 ^e	[92]
NP*	Andrographolid ^f	2600	[89, 93]
NP	Cu(TPP)Cl ₂ ^g	5000 ^e	[89, 94]
NP	Cu(MPT)Cl ₂ ^h	5100 ^e	[89, 94]
NP*	2,5-Dideoxystreptamin-Derivat 1e ⁱ	6	[95]
NP*	Naphthofluorescein Dinatriumsalz	12000	[96]
NP*	Dicoumarol-Derivat DC1 ⁱ	1040	[97]
NP*	Amidinohydrazon-Derivat B2 ⁱ	11800	[97]
NP*	Amidinohydrazon-Derivat 17 ⁱ	460	[98]

^a M: Makromoleküle, P: Peptide, PM: Peptidmimetika, NP: Nicht-peptidische Inhibitoren ^b Mutante

^c Histatin 3 ^d Histatin 5 ^e IC₅₀-Wert ^f Monopyridinium Trisuccinat-Salz ^g 4'-[4-tolyl]-2,2':6',2''-Terpyridin

^h 4'-[4-Methoxyphenyl]-2,2':6',2''-Terpyridin ⁱ Bezeichnung aus angegebener Referenz

Für die Wirkstoffentwicklung sind niedermolekulare Verbindungen ohne peptidischen Charakter die geeignetsten Strukturen. Auch aus diesem Bereich wurden für Furin einige Inhibitoren gefunden. Im Jahr 1999 wurde Andrographolid entdeckt, ein Labdan-Diterpenoid aus *Andrographis paniculata*, welches Furin im mikromolaren Bereich hemmt [93]. Später wurde auch für einige Cu- und Zn-Komplexbildner (Terpyridine) eine schwache Hemmwirkung auf Furin nachgewiesen [94]. Im Jahr 2006 wurden durch Jiao auf Dideoxystreptamin basierende Inhibitorstrukturen entwickelt, die Furin effektiv hemmen [95]. Das wirksamste Derivat besitzt einen K_i-Wert von 6 nM (Tab. 1.3). Durch Sichten einer Wirkstoffbibliothek konnten weitere Leitstrukturen entdeckt werden. Dazu ge-

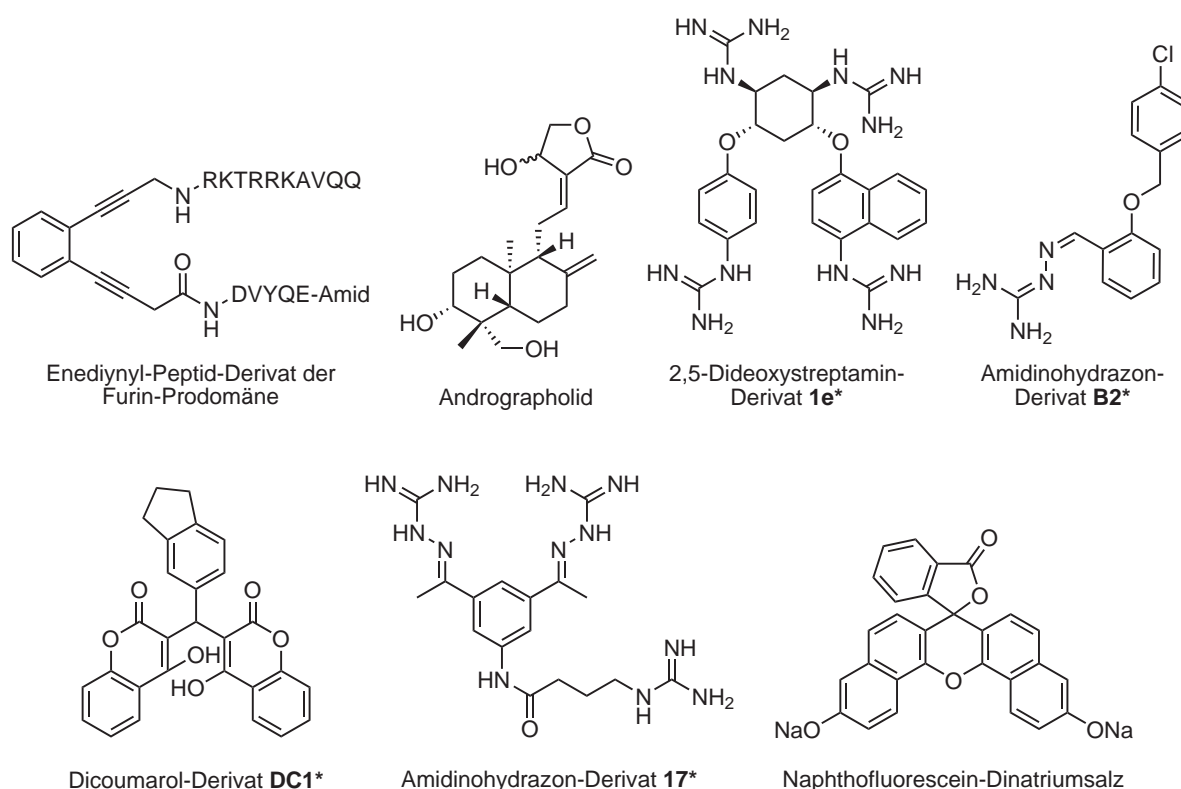


Abbildung 1.8: Strukturen ausgewählter Furininhibitoren. Die Bezeichnungen der mit einem Stern markierten Inhibitoren stammen aus den ursprünglichen Referenzen, siehe Tabelle 1.3.

hört Naphthofluorescein [96] und ein ähnlich aufgebautes Dicoumarol-Derivat [97], welches einen K_i -Wert von 1040 nM aufweist (Abb. 1.8). Interessanterweise wurde auch ein Amidinohydrazon-Derivat substituiert mit einem Chlor-Aromaten gefunden, welches nur eine geringe Inhibitorwirkung zeigte [97]. Vor kurzem wurden weitere Amidinohydrazon-Derivate beschrieben, die wirksamste Verbindung hemmt Furin mit einem K_i -Wert von 460 nM [98].

1.4.5 Kristallstruktur des Furins

Im Jahr 2003 konnte die Kristallstruktur von Maus-Furin im Komplex mit dem irreversiblen Inhibitor Dec-RVKR-CMK gelöst werden [46]. Im Bereich des katalytischen Zentrums befinden sich viele saure Aminosäuren, welche die ausgeprägte Präferenz des Furins für multibasische Substrate erklärt. In Abbildung 2.16 auf Seite 54 ist der Komplex eines Modells des Furins mit einem im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Inhibitor gezeigt. Da für die Erstellung dieses Modells ausschließlich das P1-Arginyl-Chlormethylketon-Segment verändert wurde, ist die übrige Struktur mit der veröffentlichten Kristallstruktur identisch

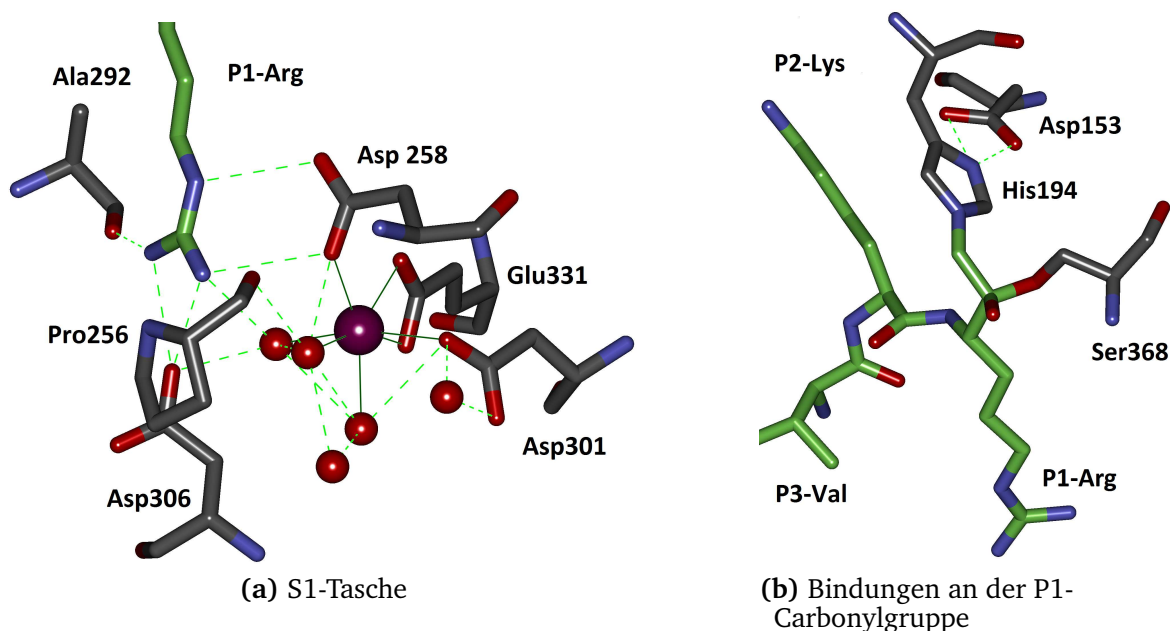


Abbildung 1.9: Darstellung der Wechselwirkung am Boden der S1-Tasche und der kovalenten Modifizierung des Furins im Komplex mit Dec-RVKR-CMK (grüne C-Atome). Hellgrün gestrichelte Linien markieren mögliche H-Brückenbindungen im Abstand bis 3,2 Å, Wassermoleküle sind als rote Kugeln dargestellt (die Bilder wurden mit Discovery Studio Visualizer 2.5, Accelrys, erstellt). Abb. (a): P1-Arginin bindet am Boden der S1-Tasche an Ala292, Asp306 und Asp258, sowie an ein Netzwerk aus Wassermolekülen. Dieses bildet zusammen mit den restlichen, dargestellten Aminosäuren einen pentagonal-bipyramidalen Komplex (dunkle Linien, 2,23–2,46 Å) mit Ca^{2+} (lila Kugel), vgl. auch Abb. 2.17a auf Seite 56. Abb. (b): Darstellung der kovalenten Bindungen der P1-Carbonylgruppe mit His194 und Ser368. Gezeigt sind die drei Aminosäuren der katalytischen Triade (dunkle C-Atome), aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden der P4- und P5-Rest des Inhibitors weggelassen.

und soll einleitend nicht weiter im Detail beschrieben werden. In Abbildung 1.9a sind deshalb nur die Interaktionen am Boden S1-Tasche aus der Originalstruktur (pdb-Eintrag 1p8j) mit der Guanidinogruppe des P1-Restes gezeigt. Die Bindetasche wird am Boden durch ein Ca^{2+} -Ion stabilisiert, welches heptavalent von Asp258, Glu331 (2×), Asp301 sowie drei weiteren Wassermolekülen koordiniert wird. Über zusätzliches Kristallwasser wird ein Netzwerk aus H-Brückenbindungen zwischen der Guanidinogruppe des P1-Restes zu Pro256, Asp306 und Ala292 ausgebildet. Durch diese vielfältigen Wechselwirkungen wird verständlich, dass Furin unbedingt einen P1-Arginin-Rest in seinen Substraten erfordert. Abbildung 1.9b zeigt im Detail das Arginyl-Methylketon-Segment, kovalent gebunden an His194 sowie die Hemikatalbindung zwischen dem katalytisch wirksamen Ser368 und der P1-Carbonylgruppe.

Die S2- und die S4-Bindetaschen (gezeigt in Abb. 2.17b und 2.17d auf Seite 56) sind ebenfalls für die Selektivität des Furins von großer Bedeutung. So wird in der S2-Tasche die Seitenkette von Lysin oder Arginin akzeptiert, während in der S4-Tasche bevorzugt Substrate mit einem Arginin-Rest gebunden werden. In dieser Bindetasche wird ebenfalls ein komplexes Netzwerk aus H-Brücken zwischen Furin und den verschiedenen Stickstoff-Atomen der P4-Guanidinogruppe der Substrate oder Inhibitoren ausgebildet [58, 59].

1.5 Ziel der Arbeit

Ausgehend von der bekannten Konsensussequenz für Furinsubstrate ...-Arg-X-Lys/Arg-Arg↓-X... [100] und der bekannten Kristallstruktur von Maus-Furin [46] im Komplex mit dem irreversiblen Referenzinhibitor Dec-RVKR-CMK (Abb. 1.10 [75]) sollten im Rahmen dieser Arbeit neuartige und möglichst wirksame, reversibel bindende Furininhibitoren entwickelt, synthetisiert und charakterisiert werden.

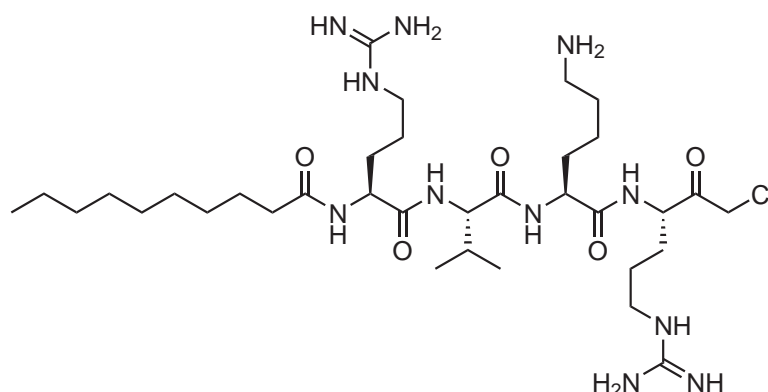


Abbildung 1.10: Struktur des irreversibel bindenden Inhibitors Decanoyl-RVKR-chlormethylketon, auf dessen Basis die neuen Inhibitoren entwickelt werden sollen.

Die weiteren Ziele bestanden darin:

- Wirkstoffe zu entwickeln, die möglichst stabil sind und eine möglichst geringe Toxizität besitzen, um sie für spätere Untersuchungen in Zellkultur einsetzen zu können.
- Selektiv furinartige Propeptidkonvertasen zu inhibieren, mit möglichst geringer Hemmwirkung auf trypsinartige Serinproteasen, wie Enzyme der Blutgerinnungskaskade und Fibrinolyse. Dazu sollte das Arginyl-Chlormethylketon-Segment des Referenzinhibitors durch decarboxylierte Arginin-Mimetika ausgetauscht werden. Diese Strategie wurde für trypsinartige Serinproteasen bereits beschrieben

1 Einleitung

[101–103], allerdings noch nicht für Proproteinkonvertasen eingesetzt. Die weitere Optimierung der Struktur sollte durch Variationen der Aminosäurereste in den anderen Positionen der Peptidkette sowie durch die gezielte Verwendung von nicht-natürlichen Aminosäurederivaten erreicht werden.

- Durch Variationen der P5-Position Affinität, Bioverfügbarkeit und andere physikalisch-chemische Eigenschaften der Moleküle, z. B. Lösungsverhalten oder UV-Vis-Absorption zu beeinflussen. Aus den Substratsequenzen ist bekannt, dass Furin an die P5-Position keine speziellen Anforderungen stellt.
- Durch den Einsatz einer Kombination aus Lösungs- und Festphasenpeptidsynthese (SPPS) eine einfache Synthesestrategie der Wirkstoffe zu etablieren.
- Die synthetisierten Inhibitoren durch enzymkinetische Messungen auf ihre Furin-hemmwirkung (humanes Furin, *h*-Furin) zu untersuchen. Basierend auf diesen Ergebnissen sollten einige wirksame Inhibitoren ausgewählt werden, um deren Effektivität auf die Hemmung anderer furinartiger Proproteinkonvertasen in Kooperation mit der AG Day, Universität Sherbrook, Kanada zu bestimmen.
- In Kooperation mit der AG Garten, Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg, in virologischen Tests die Hemmwirkung besonders effektiver Inhibitoren auf die Vermehrung von Geflügelpest-Viren (KP-Virus, engl.: FPV, „Fowl-Plague Virus“) [8] in Zellkultur zu untersuchen. Dafür sollten Experimente zur Hemmung der Hämagglutinin-Spaltung und Eindämmung der Virusausbreitung und -vermehrung eines hochpathogenen, aviären Influenzavirus durchgeführt werden und auch eine mögliche zytotoxische Wirkung der Inhibitoren auf Zellen geprüft werden.
- Basierend auf den entwickelten Inhibitorstrukturen biotinylierte Wirkstoffe zu synthetisieren um sie für eine Affinitätschromatographie zur effektiven Reinigung von Furin einsetzen zu können (Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Than am Leibnitz-Institut für Altersforschung in Jena), da bisher nur eine Kristallstruktur mit Maus-Furin und dem irreversibel bindenden Inhibitor Dec-RVKR-CMK existiert, möglicherweise aufgrund mangelnder Reinheit des rekombinant hergestellten Furins.³
- Zwei fluorogene Furinsubstrate mit einem Aminomethylcoumarinrest in P1'-Position zu synthetisieren und zu charakterisieren.

³persönliche Informationen M. Than.

2 Ergebnisse und Diskussion

2.1 Entwicklung und Optimierung des P1-Restes

2.1.1 Entwicklung des P1-Restes

Furin spaltet Substrate mit der Konsensussequenz ...-Arg-X-Lys/Arg-Arg↓-X... [100]. Bisher existiert erst eine Kristallstruktur des Furins [46], kovalent gebunden an den irreversiblen Inhibitor Dec-RVKR-CMK (im Folgenden auch als Referenzinhibitor oder CMK-Inhibitor bezeichnet [75]). Die Struktur dieses Inhibitors und andere bekannte Substratsequenzen des Furins [58] dienten als Ausgangspunkt für das Design der neuartigen Peptidmimetika, die im Rahmen dieser Dissertation entwickelt wurden. Obwohl auch längere Substratsequenzen für die Entwicklung neuer Inhibitoren geeignet wären, wurde sich auf eine acylierte Tetrapeptidsequenz beschränkt, um das Molekulargewicht der Verbindungen zu begrenzen.

Der CMK-Inhibitor besitzt zwar eine Arginyl-Chlormethylketongruppe als P1-P1'-Segment, die stabil gegen proteolytischen Abbau durch Furin ist, dennoch sind solche CMK-Derivate *in vivo* sehr instabil (bei den strukturähnlichen Thrombininhibitoren dPhe-Pro-Arg-CMK wurde eine Halbwertszeit $t_{1/2} = 2-3$ min gefunden) [104, 105] und deshalb für die Wirkstoffentwicklung ungeeignet. In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche substratanaloge Inhibitoren trypsinartiger Serinproteasen entwickelt, die in der P1-Position ein decarboxyliertes Argininmimetikum besitzen, z. B. für das Blutgerinnungsenzym Thrombin [101-103].

Aufgrund der fehlenden P1-P1'-Amidbindung solcher Derivate ist eine Spaltung durch die Protease nicht mehr möglich. Deshalb sollte diese Strategie auch für die Entwicklung wirksamer Furininhibitoren prinzipiell einsetzbar sein. Das Fehlen der Carboxylgruppe führt generell zu einer höheren Stabilität *in vivo*, da der C-terminale Abbau der Inhibitorsequenz durch Carboxypeptidasen nicht mehr möglich ist. Neben Agmatin mit einer endständigen Guanidinogruppe als Argininmimetikum [102] und dessen kürzeren und längeren Analoga können in dieser Position auch die von einem decarboxylierten Ornithin abgeleiteten Diamine als P1-Rest eingesetzt werden. Zusätzlich ist es möglich, an-

2 Ergebnisse und Diskussion

stelle von aliphatischen Guanidinen oder Aminen geeignete zyklische P1-Reste mit einer endständigen basischen Gruppe zu verwenden.

In der P5-Position der Inhibitoren wurde initial ein Acetyl-Rest gekoppelt. Die dadurch gebildete P4–P5-Amidbindung sorgt für eine zusätzliche Stabilisierung der Peptidmimetika *in vivo*, da ein Abbau durch Aminopeptidasen ausgehend vom N-Terminus verhindert wird. Bei der Synthese der ersten Derivate ohne Seitenkettenschutz war die HPLC-Detektion der Verbindungen aufgrund fehlender aromatischer Gruppen (z. B. bei Verbindungen mit aliphatischen Aminen in P1-Position) und der damit verbundenen geringen Absorption im UV-Vis-Bereich relativ schwierig. Dieses Problem konnte durch den Austausch des Acetyls gegen einen Phenylacetyl-Rest gelöst werden, dessen Einbau in solchen Fällen eine einfache UV-Vis-Detektion der Intermediate und Inhibitoren gestattete. Daher wurde für die Kopplungen in P5-Position im weiteren Verlauf der Synthesen standardmäßig Phenylelessigsäure anstelle von Essigsäure verwendet.

In der P2-Position akzeptiert Furin sowohl Lysin als auch Arginin gleichermaßen. Da in vielen Fällen am Ende der Synthese eine Guanylierung des komplett entschützten Produktes notwendig war, stellte es sich als günstiger heraus, einen Arginin-Rest in P2-Position einzusetzen, um eine zweite Guanylierung in der Seitenkette eines Lysins auszuschließen. Die weiteren Positionen (Valin-P3, Arginin-P4) wurden für die Synthese der ersten Inhibitoren aus der Konsensussequenz übernommen und im späteren Verlauf der Arbeiten variiert.

2.1.2 Synthese der P1-Derivate

Zur Synthese der ersten Inhibitoren wurden lineare Diamine an Tritylchlorid-Harz gekoppelt. Bei der verwendeten Methode (siehe Abb. 2.1) reagiert nur eine Amingruppe mit dem Tritylchlorid-Linker des Harzes [106]. Um eine hohe Harzbeladung zu erzielen, wurde ein 4-facher Überschuss des Amins zu einer Suspension des Harzes in trockenem THF gegeben und über 2 h bei RT gekoppelt [107].

Der Aufbau der Peptidkette nach der Beladung erfolgte vom C- zum N-Terminus unter Einsatz eines Standard-Fmoc-Protokolls mit einem 4-fachen Überschuss an Aminosäure, HOBt und HBTU in Gegenwart von 8 eq DIPEA. Nach der Kopplung des P5-Acyl-Restes – in der Regel eine Acetyl- oder Phenylacetyl-Gruppe – wurde in einem Schritt mit einer Abspaltlösung aus 95 % TFA, 2,5 % Triisopropylsilan (TIS) und 2,5 % Wasser das Peptid vom Harz und gleichzeitig die Seitenkettenschutzgruppen abgespalten [108]¹. Nach

¹ siehe S. 65f. in Referenz

2.1 Entwicklung und Optimierung des P1-Restes

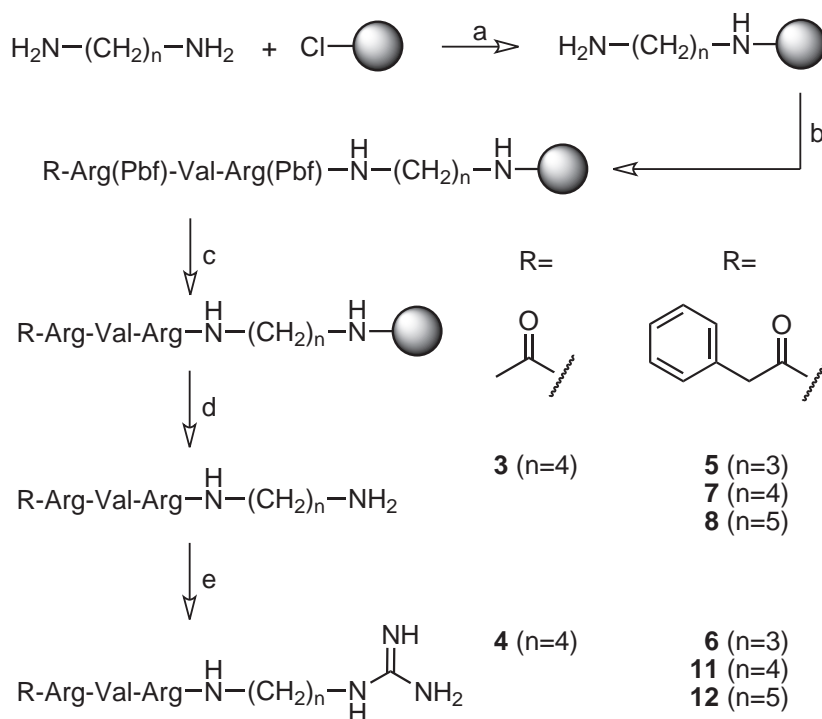


Abbildung 2.1: Syntheseschema für Furininhibitoren mit aliphatischen Aminien und Guanidinen in P1-Position. Reagenzien und Bedingungen: (a) Tritylchlorid-Harz, 2 eq Diamin, abs. THF, 2 h (Methode C); (b) Fmoc SPPS, Doppelkopplungen mit 4 eq AS (oder Essigsäure, R = $-\text{CO}-\text{CH}_3$ bzw. Phenyllessigsäure, $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$), HOBT und HBTU und 8 eq DIPEA (Methode A); (c) TFA/TIS/ H_2O (95/2,5/2,5, v/v/v), 2 h (Methode F); (d) 3 eq 1H-pyrazol-1-carboxamidin \cdot HCl, 4 eq DIPEA in 1 M Na_2CO_3 Lösung, 16 h (Methode G).

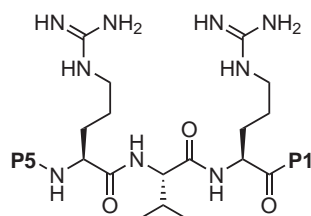
der Abspaltung wurde das Rohprodukt in kaltem Diethylether gefällt, abzentrifugiert und mit Ether mehrfach gewaschen. Durch HPLC-Kontrollen während der Abspaltung konnte festgestellt werden, dass die für den Arginin-Schutz eingesetzten Pbf-Gruppen teilweise unvollständig abgespalten wurden. In diesen Fällen wurde der Ansatz bei leicht erhöhter Temperatur (40 °C) für weitere 2 h geschüttelt, bevor die Fällung mit Ether erfolgte. Im Anschluss wurde das Rohprodukt über präparative HPLC gereinigt.

Zur Synthese der Inhibitoren mit C-terminal endständiger Guanidino-Gruppe wurden die vom Harz abgespaltenen Amin-Derivate mit 1H-pyrazol-1-carboxamidin in 1 M Na_2CO_3 umgesetzt [109]. Bei ersten Synthesen wurde DIPEA zum Ansatz gegeben, bei späteren Guanylierungen wurde auf dessen Zugabe verzichtet. Der Aufbau der Guanidinogruppe kann mittels HPLC verfolgt werden, das entstehende Produkt eluiert bei einem ca. 1 % höheren ACN-Gehalt als das Amin. Zeigte die HPLC Kontrolle nach 24 h eine unvollständige Reaktion, wurde erneut 1H-pyrazol-1-carboxamidin und DIPEA in gleicher Menge zum Ansatz gegeben, die Guanylierung war üblicherweise 24 h später beendet.

2 Ergebnisse und Diskussion

Das Produkt konnte im Anschluss direkt aus der Lösung durch präparative HPLC gereinigt werden. Mit dieser Strategie wurden die Verbindungen **3–14** synthetisiert; die Strukturen dieser Inhibitoren und deren K_i -Werte sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst.

Tabelle 2.1: Variationen des P1-Restes (Strukturen und K_i -Werte). Die Inhibitoren besitzen die allgemeine Formel:

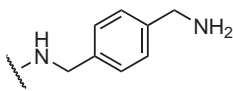
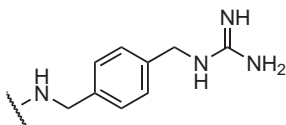
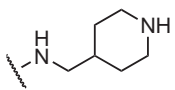
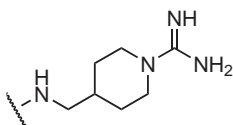
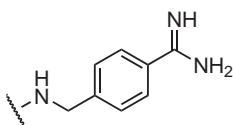
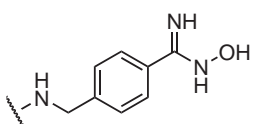


Nr.	P5	P1	K_i (nM)
3	Ac ^a		41490
4	Ac		286
7	Phac ^b		7490
11	Phac		78
5	Phac		3020
6	Phac		63
8	Phac		553
12	Phac		1070
9	Phac		1320
13	Phac		2730

Fortsetzung auf der nächsten Seite...

2.1 Entwicklung und Optimierung des P1-Restes

Tabelle 2.1: Variationen des P1-Restes (Strukturen und K_i -Werte), Fortsetzung

Nr.	P5	P1	K_i (nM)
10	Phac		627
14	Phac		1430
15	Phac		9710
16	Phac		53
17	Phac		0,81
18	Phac		71

^a Acetyl=Ac, ^b Phenylacetyl=Phac

Zusätzlich zu den aliphatischen Aminen und Guanidinen wurden auch Strukturen mit aromatischen Ringen in P1-Position synthetisiert (ebenfalls in Tab. 2.1 abgebildet). Die Synthese erfolgte analog zu der Synthese der linearen Amine unter Verwendung von *m*-Xylylendiamin und *p*-Xylylendiamin für die Ausgangsbeladung des Tritylchlorid-Harzes und führte zu den Verbindungen 9, 10, 13 und 14.

Im weiteren Verlauf der Inhibitorentwicklung wurde für die P1-Position auch die vom Piperidin abgeleitete Verbindung 4-(Aminomethyl)piperidin sowie das Benzamidin-Derivat 4-(Aminomethyl)benzamidin (4-Amba) eingesetzt. Die Synthese dieser Verbindungen verlief nach einer etwas anderen Strategie (siehe Abbildung 2.2 auf der nächsten Seite). Zunächst wurde das säurelabile 2Cl-Tritylchlorid-Harz mit Fmoc-Arg(Pbf)-OH beladen. Nach SPPS bis zum P5-Rest wurde das Peptid unter relativ mild-sauren Bedingungen unter Erhalt der Seitenkettenschutzgruppen mit 1 % TFA in DCM vom Harz abgespalten. Um eine Nebenreaktion durch Abspaltung der Schutzgruppen dennoch weitestgehend auszuschließen, wurde die Abspaltzeit auf 2×30 min begrenzt und das Lö-

2 Ergebnisse und Diskussion

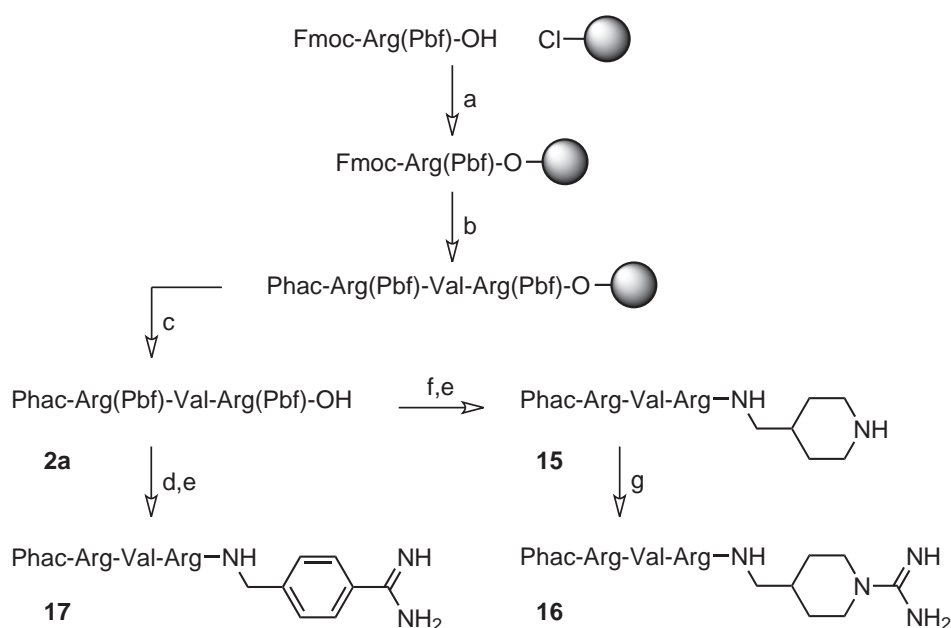


Abbildung 2.2: Syntheschema für zyklische Amine und Guanidine in P1. Reagenzien und Bedingungen: (a) Beladung von 2Cl-Tritylchlorid-Harz, 1 eq Fmoc-Arg(Pbf)-OH, 4 eq DIPEA, abs. DCM, 2 h (Methode B); (b) Fmoc SPPS, Bedingungen siehe Abb. 2.1; (c) 1 % TFA in DCM, 2 × 30 min (Methode D); (d) **2a**, 1,1 eq PyBOP, 3 eq 6-Cl-HOBt, 3 eq DIPEA in DMF, 2 h (Methode E); (e) TFA/TIS/H₂O (95/2,5/2,5 v/v/v), 2 h (Methode F); (f) 1-Boc-4-(aminomethyl)piperidin, 1,1 eq PyBOP, 3 eq 6-Cl-HOBt, 3 eq DIPEA in DMF, 2 h; (g) 3 eq 1H-pyrazol-1-carboxamidin · HCl, 4 eq DIPEA in 1 M Na₂CO₃, 16 h (Methode G).

Lösungsmittel jeweils direkt im Anschluss *in vacuo* entfernt. Versuche, die Trifluoressigsäure mit 10 % Pyridin in MeOH (v/v) abzufangen, zeigten keinen Vorteil gegenüber der zuerst verwendeten Methode. Der Seitenkettenschutz blieb in beiden Fällen erhalten [108]².

Nach der Harzabspaltung erfolgte die Kopplung des freien C-Terminus des P5–P2-Segmentes an 4-(Aminomethyl)benzamidin. Dazu wurde das Peptid zunächst in DMF mit 6Cl-HOBt suspendiert, welches als Additiv eine mögliche Racemisierung bei der Segmentkopplung verhindern sollte. Anschließend erfolgte die Zugabe des Kopplungsreagenz (PyBOP), die Reaktion wurde dann durch Zugabe von DIPEA gestartet. Die homogene Suspension wechselte ihre Erscheinung bei Zugabe der Hilfsbase über einen Zeitraum von 2–10 min meist von bräunlich trüb zu klar gelb. Reaktionskontrollen mittels HPLC zeigten üblicherweise nach wenigen Minuten eine vollständige Kopplung. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurden die Schutzgruppen, wie für die Amine und Guanidine bereits beschrieben, entfernt und nach Fällung in Diethylether Inhibitor **17** als Endprodukt erhalten.

²siehe S. 73f. in Referenz

Für die Synthese von Inhibitor **15** konnte das Intermediat **2a** (Abb. 2.2) mit 1-Boc-4-(aminomethyl)piperidin analog zur Synthese des Inhibitors **17** gekoppelt und aufgearbeitet werden. Nach Abspaltung der Schutzgruppen und präparativer Reinigung wurde Inhibitor **15** erhalten. Für die Synthese des Inhibitors **16** erfolgte analog zu den vorigen Synthesen eine Guanylierung des Piperidin-Restes des Inhibitors **15** mit 1*H*-pyrazol-1-carboxamidin.

Unter Verwendung der gleichen Strategie konnte das Hydroxyamidino-Prodrug **18** synthetisiert werden, indem an das Intermediat **2a** zunächst 4-Cyanobenzylamin gekoppelt wurde. Im Anschluss erfolgte eine Umsetzung mit Hydroxylamin, um das Nitril in einen Hydroxyamidin-Rest zu überführen (siehe Experimententeil, Seite 92). Die Inhibitoren **15–18** sind ebenfalls mit ihren entsprechenden Strukturen und K_i -Werten in Tabelle 2.1 zusammengefasst.

2.1.3 Bestimmung der Inhibitorkonstanten

Die Bestimmung der K_i -Werte von den meisten Inhibitoren erfolgte standardmäßig mittels eines fluorogenen Tests unter Michaelis-Menten-Bedingungen [81]. Dieser wurde immer von einer gleichzeitigen Bestimmung der enzymkinetischen Parameter V_{max} und K_m begleitet (vS -Charakteristik). Als Substrat wurde Pyr-RTKR-AMC³ in drei bis vier verschiedenen Konzentrationen verwendet. Die aus den Zeit-Umsatz-Kurven erhaltenen steady-state Geschwindigkeiten v wurden als Funktion der Inhibitorkonzentration für jede Substratkonzentration aufgetragen. Durch Anpassung der Daten an die Gleichung für kompetitive, reversible Hemmung (siehe Gleichung (4.1) auf Seite 83) konnte so ein K_i -Wert als Anpassung über alle Messpunkte erhalten werden. Die Auswertung der gewonnenen Messwerte ist beispielhaft in Abbildung 2.3a auf der nächsten Seite für Inhibitor **17** gezeigt.

Die erhaltenen Messdaten werden von dem verwendeten Plattenleser (Tecan Safire II) in Fluoreszenzeinheiten (RFU) ausgegeben. Diese können in die entsprechende AMC-Konzentration umgerechnet werden, falls notwendig. Deshalb wurde eine Eichkurve des AMCs gemessen, die unter den gleichen Bedingungen wie für die Inhibitormessungen bestimmt wurde. Der Graph befindet sich im Anhang, Abb. B.1 auf Seite IV. Dort sind auch die verwendeten Messparameter und Einstellungen des Plattenlesers aufgeführt, die für die Standardbestimmung des K_i -Wertes verwendet wurden. Für die Bestimmung der K_i -Werte ist es allerdings unerheblich, ob die Geschwindigkeit v in RFU/s oder in einer Konzentration/s angegeben wird. Darum erfolgte bei den Auswertungen der Daten keine generelle Umrechnung der RFU in die tatsächlichen Konzentrationen.

³Bachem, Schweiz.

2 Ergebnisse und Diskussion

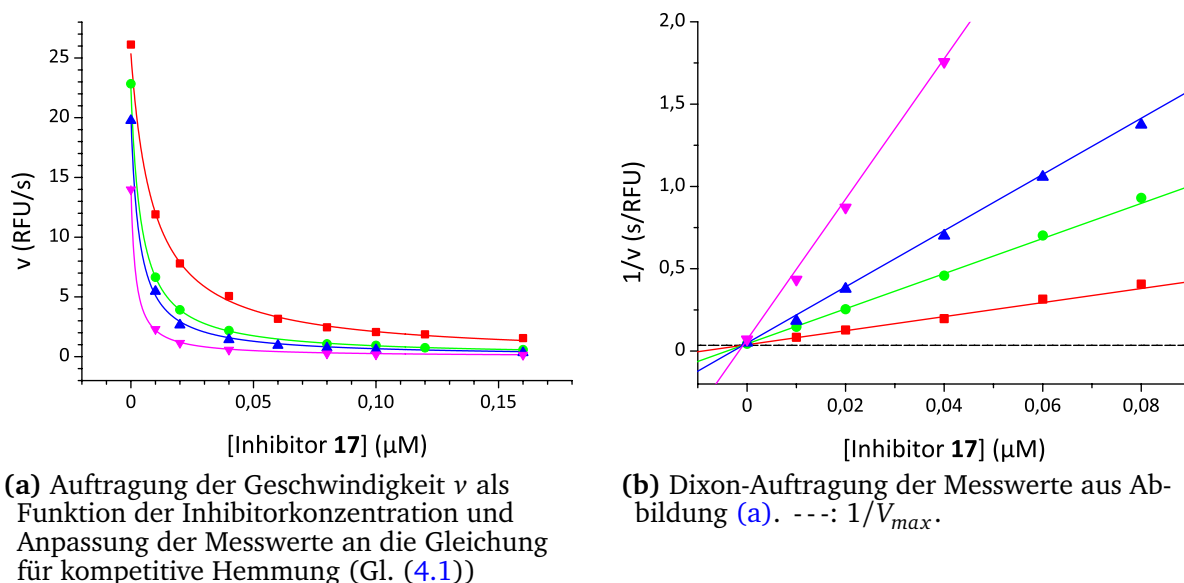


Abbildung 2.3: Bestimmung des K_i -Wertes von Inhibitor 17 (Phac-RVR-4-Amba). Verwendete Substratkonzentrationen: ▼ 3,25 μM , ▲ 8,125 μM , ● 13 μM , ■ 32,5 μM .⁴

Zusätzlich zu der Bestimmung des K_i -Wertes durch die Anpassung der Messdaten an die Gleichung für kompetitive Hemmung kann eine linearisierte Auftragung nach der Methode von Dixon erfolgen [110]. Bei diesem Verfahren wird die reziproke Umsatzgeschwindigkeit $1/v$ bei verschiedenen Substratkonzentrationen als Funktion der Inhibitor-Konzentration aufgetragen und aus dem Schnittpunkt der Geraden $-K_i$ bestimmt. (Abb. 2.3b). Dabei ist die zusätzliche Auftragung von $1/V_{max}$ als Parallele zur Abszisse möglich, die sich ebenfalls mit den anderen Geraden in $x = -K_i$ schneidet. Bei einem reversibel-kompetitiven Hemmmechanismus resultieren durch diese Auftragung immer Geraden, deren gemeinsamer Schnittpunkt im II. Quadranten liegt.

Die K_i -Werte der Inhibitoren mit den verschiedenen P1-Resten sind in Abbildung 2.4 nochmals graphisch zusammengefasst. Der direkte Vergleich analoger Inhibitoren mit Acetyl- oder Phenylacetyl-Gruppe in P5-Position zeigt, dass die Phenylacetyl-Gruppe nicht nur zu einer besseren Detektierbarkeit der Verbindungen während der HPLC-Analyse führt, sondern auch eine leichte Verbesserung des K_i -Wertes resultiert (vgl. Verbindungen 3 und 7, sowie 4 und 11 in Abbildung 2.4). Deshalb wurde im weiteren Verlauf der Synthesen bevorzugt Phenylelessigsäure für die Kopplung in der P5-Position verwendet.

⁴Die aufgeführten Substratkonzentrationen wurden im Gegensatz zu den Werten aus der Veröffentlichung [111] mit dem vom Hersteller angegebenen Peptidgehalt korrigiert. Da das Verhältnis S/K_m allerdings unverändert bleibt, hat dies keinen Einfluss auf die K_i -Werte.

2.1 Entwicklung und Optimierung des P1-Restes

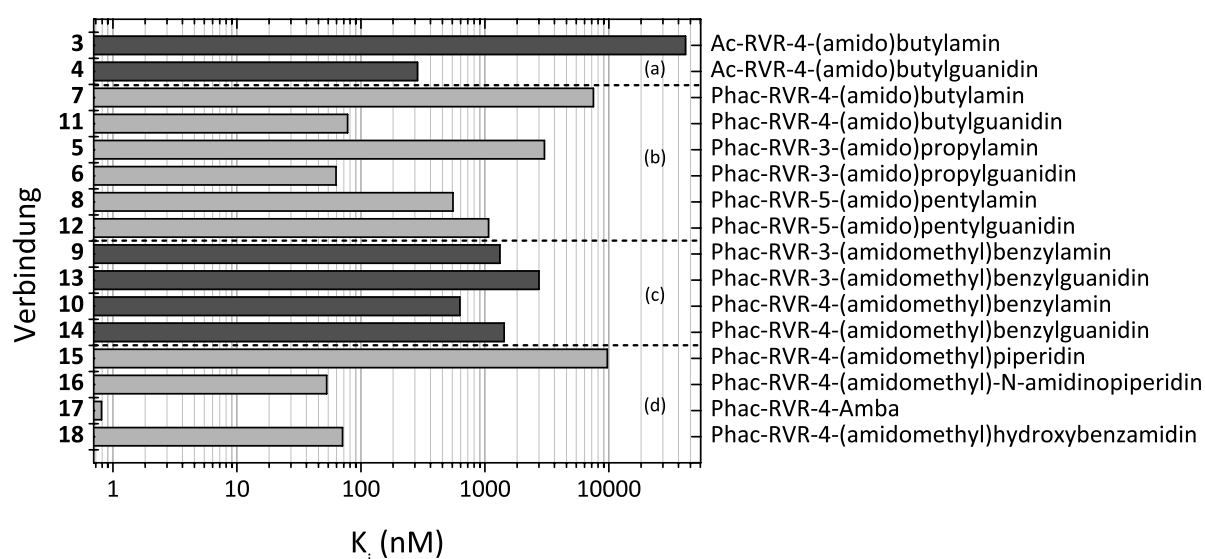


Abbildung 2.4: Vergleich der K_i -Werte unterschiedlicher P1-Derivate. (a) Die Acetyl-Derivate **3** und **4** zeigen eine leicht verringerte Hemmwirkung im Gegensatz zu den Phenylacetyl-Verbindungen (**7** und **11**). (b) Die Amin-Inhibitoren mit 3 oder 4 Methylengruppen im P1-Rest (**5** und **7**) zeigen eine schwache Hemmwirkung, die durch Guanylierung zu den entsprechenden Agmatinen in P1-Position (**11**, Agmatin und **6**, *nor*-Agmatin) verbessert werden kann. Das 5-(Amidomethyl)pentylamin-Derivat (**8**) kann Furin im Vergleich zu den anderen Aminen besser hemmen. Die Guanylierung zum *homo*-Agmatin-Derivat verringert allerdings die Hemmwirkung. (c) Verbindungen mit aromatischen Aminen und Guanidinen (**9**, **10**, **13**, **14**) besitzen ähnliche K_i -Werte wie die *homo*-Agmatin-Derivate, wobei eine Guanylierung ebenfalls zu einer geringeren Hemmkonstante führt. (d) Das Piperidin-Derivat **15** hemmt Furin ähnlich schwach wie Inhibitor **7**, während der guanylierte Inhibitor **16** vergleichbar effektiv wie Inhibitor **11** wirkt. Die mit Abstand beste Hemmwirkung wurde für das 4-Amba-Derivat **17** bestimmt ($K_i = 0,81$ nM), während das Hydroxyamidino-Derivat **18** (4-Hydroxyamba) weniger wirksam ist.

Wie bereits für Thrombininhibitoren beschrieben [101, 102], sollten auch im Rahmen dieser Arbeit neben der decarboxylierten Arginin-Gruppe (Agmatin) aus Inhibitor **11** ebenfalls die um eine Methylengruppe verlängerten *homo*-Agmatin und die verkürzten *nor*-Agmatin-Derivate sowie die entsprechenden Amine synthetisiert werden. Vergleicht man zunächst die K_i -Werte der Amin-Inhibitoren **5**, **7** und **8** mit den Guanidinen **6**, **11** und **12**, erkennt man zwei Effekte, die die Inhibitorkonstante beeinflussen. Im Fall der Propyl- und Butyl-Derivate, aber nicht bei den Pentyl-Verbindungen, sind die guanylierten Verbindungen wirksamer (siehe Abb. 2.4). So zeigen die guanylierten Inhibitoren mit 3 (**6**) bzw. 4 C-Atomen in der P1-Seitenkette (**11**) eine ähnlich starke Furinhemmung (63 bzw. 78 nM), der K_i -Wert der korrespondierenden Amine liegt jedoch über 1 μ M. Wird die Kohlenstoffkette um eine Methylengruppe verlängert, kehrt sich dieses Muster um. Bei der *homo*-Agmatin-Gruppe in P1-Position sinkt die Affinität auf 1,07 μ M ab, während das analoge Amin (**8**) immerhin noch eine Hemmkonstante von 0,55 μ M aufweist. Anscheinend

2 Ergebnisse und Diskussion

sind die *nor*-Agmatin- und Agmatin-Gruppen geeignet, um die S1-Tasche des Enzyms zu besetzen. Eine Verlängerung auf 5 C-Atome wird im Falle des *homo*-Agmatin-Derivats **12** nicht akzeptiert, was offensichtlich durch sterische Probleme bedingt ist.

Im Gegensatz zu den Agmatin-Derivaten sind sämtliche Inhibitoren mit einer (Amidomethyl)benzylamin- oder Benzylguanidin-Struktur deutlich weniger wirksam (**9**, **10**, **13** und **14**). Weil die guanylierten Inhibitoren ebenfalls einen höheren K_i -Wert als die entsprechenden Amine aufweisen, ist es wahrscheinlich, dass auch hier sterische Effekte zu einer relativ schwachen Bindung führen. Zählt man einfach die C-Atome zwischen dem Amid-NH und der endständigen Amino- oder Guanidinogruppe, kommt man auf 5 oder 6 C-Atome. Demzufolge ist der Rest mindestens genauso lang, wie beim *homo*-Agmatin-Derivat.

Der Inhibitor **15** mit einem C-terminalen Piperidin-Rest [[112](#)] ist nur schwach wirksam. Dies begründet sich offensichtlich durch das Fehlen der Guanidinogruppe. Zusätzlich ist zu vermuten, dass die Piperidin-Gruppe allein nicht tief genug in die S1-Tasche reicht, um an die dort vorhandenen, sauren Aminosäurereste zu binden. Durch Guanylierung wurde Inhibitor **16** erhalten (K_i -Wert: 53 nM), der Furin ähnlich wirksam wie der Agmatin-Inhibitor **11** hemmt.

Durch die Einführung eines 4-(Amidino)benzylamin-Restes in P1-Position wurde der hochwirksame Thrombininhibitor Melagatran und das davon abgeleitete Hydroxyamidino-Prodrug Ximelagatran entwickelt [[113](#)]. Obwohl erste Messungen mit reinem 4-(Aminomethyl)benzamidin und Benzamidin nur eine sehr schwache Furinhemmwirkung mit K_i -Werten von 1,2 bzw. 0,75 mM zeigten, wurde dennoch die 4-Amidinobenzylamin-Gruppe als P1-Rest verwendet. Überraschenderweise zeigte Inhibitor **17** eine sehr starke Furinhemmung mit einem K_i -Wert von 0,81 nM. Das Hydroxyamidino-Derivat **18** (Phac-RVR-Hydroxyamba) erwies sich erwartungsgemäß als weniger wirksam, obwohl dessen K_i -Wert mit 71 nM noch im Bereich des Agmatin-Inhibitors **11** liegt.

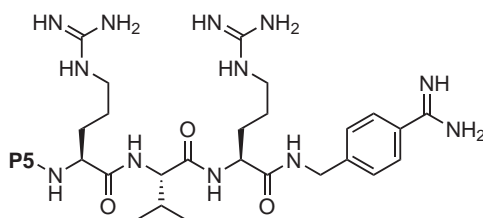
Die starke Wirksamkeit des Inhibitors **17** kann durch die effektive Bindung der Benzamidin-Gruppe zu zwei Aspartat-Resten am Boden der S1-Tasche erklärt werden (siehe auch: Strukturmodell des Inhibitors **74** mit Maus-Furin, Abbildung [2.17a auf Seite 56](#)). Der aromatische Ring sorgt dabei für eine optimale Besetzung der Bindungstasche und führt vermutlich zusätzlich zu einer Konformationsstabilisierung des P1-Restes. Aufgrund der starken Furinhemmung, wurde Inhibitor **17** als Ausgangsstruktur für weitere Optimierungen an der Inhibitorsequenz ausgewählt.



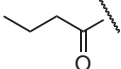
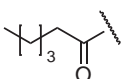
2.2 Modifizierungen am P5-Rest

2.2.1 Fettsäurederivate

Durch die beiden Guanidino-Gruppen in der P2- und der P4-Position und die Benzamidin-Gruppe ist Inhibitor **17** stark basisch und sehr hydrophil ($\text{cLogP: } -2,173$)⁵. Solche Strukturen sind meist nur in sehr geringem Maße in der Lage, Zellmembranen zu durchdringen und in der Regel auch wenig bioverfügbar [114,115]. Um für Untersuchungen in Zellkulturen die Membranpermeabilität und damit die Zellgängigkeit zu verbessern, wurden die Inhibitoren mit hydrophoben Acyl-Resten in P5-Position modifiziert (Tabelle 2.2). Aus der Literatur sind mehrere Beispiele bekannt, dass diese Art Modifikation die Aktivität von Inhibitoren in Zellkulturversuchen deutlich erhöhen kann [116–118]. Es muss jedoch dabei berücksichtigt werden, dass es nach Ankopplung langkettiger Fettsäurereste zur spontanen Bildung mizellärer oder lamellarer Strukturen ab der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) kommen kann [119], da Verbindungen mit stark polaren Gruppen am Kopfende und einem hydrophoben Acyl-Rest amphipatische Eigenschaften aufweisen.

Tabelle 2.2: Modifizierungen des P5-Restes. Als Referenz wurde für ausgewählte Verbindungen zusätzlich zu den bereits vorhandenen K_i -Werten ein IC_{50} -Wert ermittelt, da bei einigen Derivaten (26, 27) kein K_i -Wert bestimmbar war. Die Strukturen entsprechen der allgemeinen Formel:



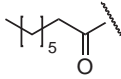
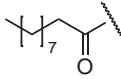
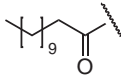
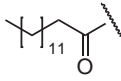
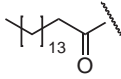
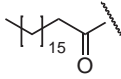
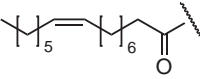
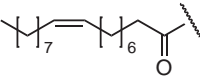
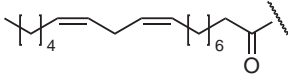
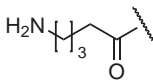
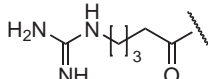
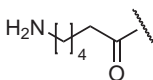
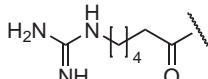
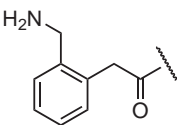
Nr.	P5	K_i (nM)	IC_{50} (nM)
45		7,6	33
19		1,0	nb ^a
20		0,67	nb
21		0,78	nb

Fortsetzung auf der nächsten Seite. . .

⁵Berechnet mit Chemdraw, Camebridgesoft, Version 12.0.2.

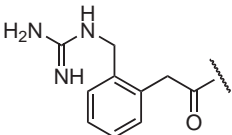
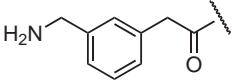
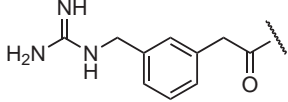
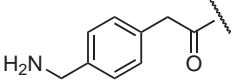
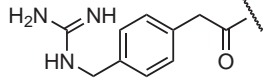
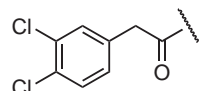
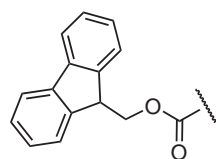
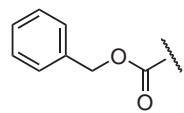
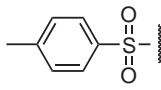
2 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 2.2: Modifizierungen des P5-Restes, Fortsetzung

Nr.	P5	K _i (nM)	IC ₅₀ (nM)
22		0,67	3,1
23		1,6	8,3
24		5,6	nb
25		49,7	nb
26		nb	119
27		nb	16310
28		62,9	289
29		154	1250
30		5,4	9,1
31		0,073	nb
32		0,06	nb
33		0,1	nb
34		0,086	nb
35		0,11	nb

Fortsetzung auf der nächsten Seite. . .

Tabelle 2.2: Modifizierungen des P5-Restes, Fortsetzung

Nr.	P5	K _i (nM)	IC ₅₀ (nM)
36		0,181	nb
37		0,037	nb
38		0,0056	nb
39		0,028	nb
40		0,014	nb
41		1,2	nb
42		8,5	nb
43		2,4	nb
44		5,3	nb

^a nb: nicht bestimmt

Aufgrund des niedrigeren Schmelzpunktes von Fettsäuren mit cis-Doppelbindungen wird deren Tendenz zur Mizellbildung bei RT verringert [120]. Darum wurden zusätzlich auch ungesättigte Fettsäurereste in P5-Position eingeführt, um einen direkten Vergleich mit den entsprechenden gesättigten Derivaten zu ermöglichen. Die Synthese erfolgte analog der beschriebenen Strategie für Inhibitor 17, außer dass in P5-Position während der SPPS anstelle der Phenylessigsäure die entsprechenden Fettsäurederivate gekoppelt wur-

2 Ergebnisse und Diskussion

den. In einigen Fällen, besonders bei sehr hydrophoben Acyl-Resten (**26**, **27**), war es nicht möglich, K_i -Werte zu bestimmen. Deshalb wurden für diese Inhibitoren IC_{50} -Werte ermittelt. Die Strukturen, K_i - und IC_{50} -Werte der Verbindungen mit unterschiedlichen P5-Resten sind in Tabelle 2.2 zusammengefasst.

Die Kettenlänge der in P5-Position eingebauten Acyl-Reste wurde zwischen 0 und 18 C-Atomen variiert, wobei nur die geradzahligen Derivate verwendet wurden. Wie sich bereits bei der Synthese zeigte, wiesen die Inhibitoren mit längererkettigen P5-Gruppen – wie bereits vermutet – deutlich amphiphile Eigenschaften, beispielsweise starkes Schäumen während der Evaporation der Lösungsmittel während der Synthesen, auf.

Vergleicht man die aus der enzymkinetischen Bestimmung erhaltenen K_i -Werte, zeigt der Inhibitor Acetyl-RVR-4-Amba ($K_i = 1,0$ nM) im Gegensatz zu Derivat **17** eine leicht reduzierte Hemmwirkung. Dieses Ergebnis wurde bereits bei Inhibitoren mit anderen P1-Resten erhalten (siehe Abschnitt 2.1.3 auf Seite 27). Das Fehlen einer N-terminalen P5-Gruppe (Inhibitor **45**, $K_i = 7,6$ nM), führt zu einem etwas stärkeren Verlust der inhibitorischen Aktivität. Aus dem Strukturmodell mit Maus-Furin (siehe Abb. 2.17d auf Seite 56) wird ersichtlich, dass eine Wasserstoff-Brückenbindung zwischen dem Acyl-Carbonylkohlenstoff in P5-Position mit einem N- ω des P4-Arginylrestes existiert, die bei fehlender P5-Gruppe nicht mehr vorhanden ist. Derartige Wechselwirkungen können aber möglicherweise die Konformation des gebundenen Inhibitors am Enzym oder bereits in Lösung stabilisieren [121, 122].

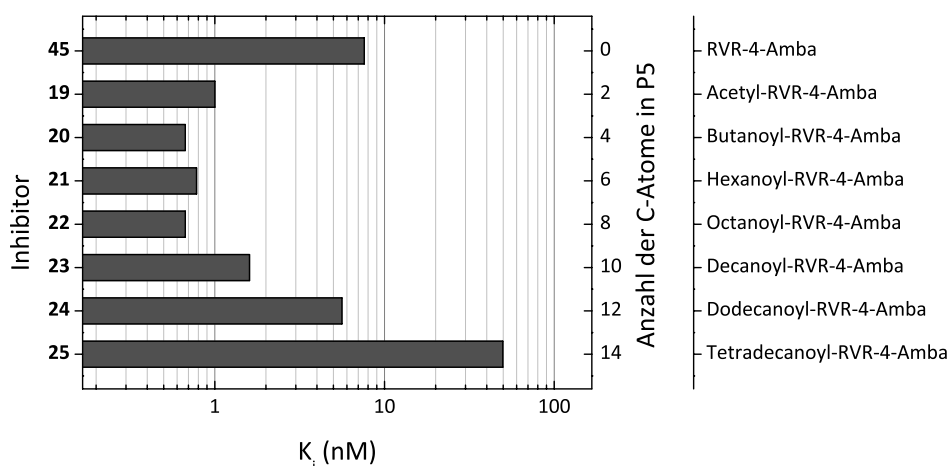


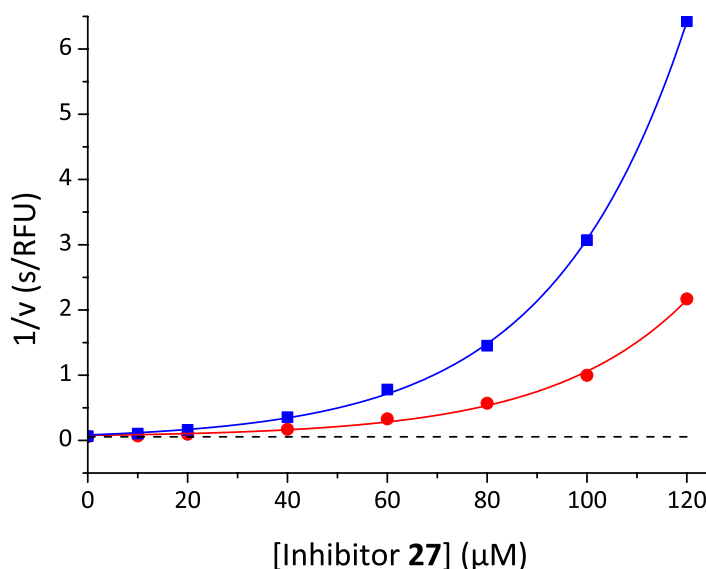
Abbildung 2.5: Einfluss der Kettenlänge in P5-Position auf den K_i -Wert.

Das Verlängern der Acylkette auf 4 C-Atome führt zu einer verstärkten Hemmung, vergleichbar mit der von Inhibitor **17**. Bis zu einer Kettenlänge von 8 C-Atomen bleibt diese

Aktivität annähernd gleich, verschlechtert sich dann aber mit jeder weiteren Kettenverlängerung. Die K_i -Werte sind in Abbildung 2.5 als Diagramm dargestellt.

Die K_i -Werte fast aller Fettsäure-Derivate konnten unter Anwendung des Standardtests und der Auswertung über Dixon-Auftragung bzw. durch nicht-lineare Kurvenanpassung erhalten werden. Den Versuch, die Inhibitoren Stearoyl- und Palmitoyl-RVR-4-Amba (**26** und **27**) unter diesen Bedingungen zu messen, führte jedoch zu exponentiellen Kurven in der Dixon-Auftragung (siehe Abb. 2.6). Vermutlich kommt es mit diesen Inhibitoren auf-

Abbildung 2.6: Dixon-Auftragung des Inhibitors **27**, Stearoyl-RVR-4-Amba. ---: $1/V_{max}$, ●: $32,5 \mu\text{M}$ Substratkonzentration, ■: $13 \mu\text{M}$ Substratkonzentration. Nur zur Veranschaulichung wurden die Werte an eine Gleichung für exponentielles Wachstum angepasst, ohne Rückschlüsse auf den Hemmmechanismus zu ziehen oder damit einen K_i -Wert zu berechnen. Für Inhibitor **26** wurde ein ähnliches Ergebnis erhalten (nicht gezeigt).



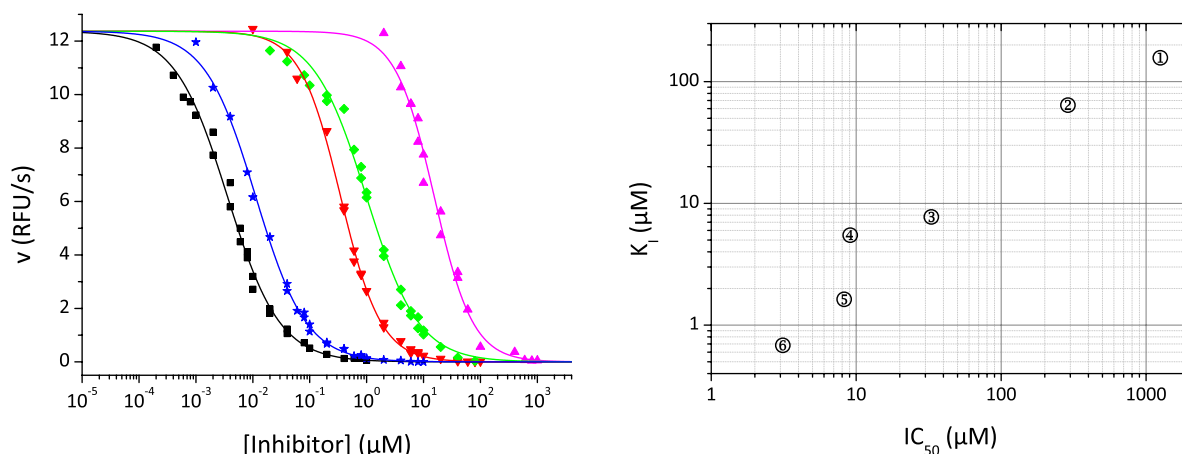
grund ihres stark amphiphilen Charakters zur Bildung von Mizellen in Lösung, wodurch die effektive Inhibitorkonzentration im Messansatz beeinflusst wird. Es wurden daher zu einem späteren Zeitpunkt mit Inhibitor **27** Untersuchungen zur Partikelbildung durchgeführt (siehe Abschnitt 2.2.2 auf Seite 37). Dennoch ist es möglich, auch bei einem abweichenden oder unbekannten Hemmmechanismus einen IC_{50} -Wert für diese Inhibitoren zu bestimmen. Liegt andererseits ein reversibel kompetitiver Hemmmechanismus vor, kann aus dem IC_{50} -Wert über Gleichung (2.1) der K_i -Wert berechnet werden [123]:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{s}{K_m}} \quad (2.1)$$

Einige IC_{50} -Bestimmungskurven, die aus den Messungen erhalten wurden, sind in Abbildung 2.7a auf der nächsten Seite gezeigt. Die Messwerte wurden an Gleichung (4.2) auf Seite 84 angepasst. Mit der verwendeten Substratkonzentration von $8,125 \mu\text{M}$ und dem bestimmten K_m -Wert ($2,5$ – $4,5 \mu\text{M}$ je nach Messung) ergibt sich für den IC_{50} -Wert ein ca. 3–4-mal höherer Wert als für die Inhibitorkonstante K_i . Eine direkte, lineare Korrela-

2 Ergebnisse und Diskussion

tion der K_i - und IC_{50} -Werte ist in Abbildung 2.7b zu sehen, wobei der Zusammenhang zwischen den beiden Werten leicht deutlich wird. Aufgrund der oben beschriebenen Abweichungen war es jedoch nicht möglich, für die Inhibitoren **26** und **27** aus dem IC_{50} -Wert einen K_i -Wert zu berechnen.



(a) IC_{50} -Kurven für ausgewählte Inhibitoren mit modifiziertem P5-Rest. Alle Messungen wurden mit $8.125 \mu\text{M}$ Substrat durchgeführt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nicht alle gemessenen Kurven gezeigt (Werte siehe Tab. 2.2 auf Seite 31).

(b) Korrelation zwischen den K_i - und IC_{50} -Werten einiger Inhibitoren, von denen beide Werte bestimmt wurden. Die eingekreisten Zahlen entsprechen den Inhibitoren, die in der unten stehenden Legende angegeben sind.

Abbildung 2.7: ①+◆: Olenoyl-RVR-4-Amba (**29**), ②+▼: Palmitoleinoyl-RVR-4-Amba (**28**), ③: RVR-4-Amba (**45**), ④+★: Linoyl-RVR-4-Amba (**30**), ⑤: Decanoyl-RVR-4-Amba (**23**), ⑥+■: Octanoyl-RVR-4-Amba (**22**), ▲: Stearoyl-RVR-4-Amba (**27**).

Durch die Einführung nicht konjugierter, cis-ständiger Doppelbindungen in die Inhibitoren mit längererkettigen Fettsäureresten sollte die Bildung mizellärer Strukturen reduziert werden. Eine Gegenüberstellung der IC_{50} -Werte des gesättigten C-18 Derivats mit den Werten der entsprechenden ungesättigten Analoga zeigt eine deutliche Verbesserung der Wirksamkeit pro eingeführter cis-Doppelbindung (siehe Abb. 2.8).

Es besteht also ein direkter Zusammenhang zwischen dem IC_{50} -Wert und der Anzahl der Doppelbindungen bei den C-18-Derivaten in P5-Position. Um aber eine Erklärung für die Abweichung von der Linearität bei den Messungen von Inhibitor **26** und **27** zu finden wurden Partikelgrößenbestimmungen für diese Verbindungen in Lösung durchgeführt.

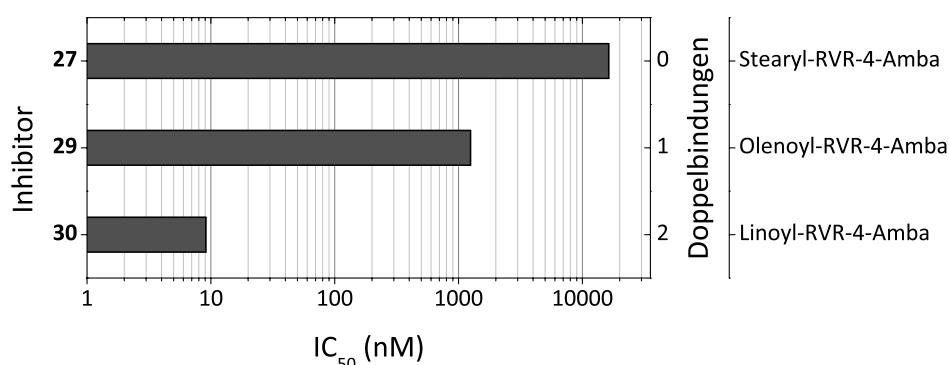


Abbildung 2.8: IC_{50} -Werte für Inhibitoren mit gesättigten und ungesättigten C18-Fettsäureresten.

2.2.2 Untersuchungen zur Partikelgröße und Mizellenbildung⁶

Die Fluidität von Zellmembranen wird primär durch die Lipidzusammensetzung beeinflusst. Durch die Einführung von ungesättigten Fettsäuren mit cis-Doppelbindungen in der P5-Position ist eine Zusammenlagerung der hydrophoben Ketten im Gegensatz zu den gesättigten Derivaten erschwert. Dies führt zu einer höheren Beweglichkeit der Moleküle und somit zu einer verminderten Bildung kompakter oder geordneter Strukturen. Die insgesamt reduzierte Hemmwirkung bei den Derivaten mit langen Fettsäureresten könnte möglicherweise auf die Bildung mizellärer oder lammellarer Strukturen zurückgeführt werden. Um dies aufzuklären, wurden von einigen Inhibitoren mit unterschiedlich langen Fettsäureresten Partikelgrößenbestimmungen an einem Zetasizer der Firma Malvern⁷ durchgeführt [124, 125]. Dabei wird die Bildung von Partikeln im Bereich von 100–3000 nm Durchmesser (abhängig von der Konzentration der verwendeten Inhibitorlösungen) durch eine Streulichtmessung bestimmt. In [Abbildung 2.9 auf der nächsten Seite](#) ist die prozentuale Streulichtintensität der gebildeten Partikel dieses Größenbereichs in Messpuffer als Funktion der Inhibitorkonzentration aufgetragen.

Es ist zu erkennen, dass die Acetyl-, Octanoyl- und Decanoyl-Derivate bei keiner der eingesetzten Konzentrationen größere Partikel im verwendeten Puffer bilden; die Streulichtintensität liegt im Bereich des reinen Puffers. Die P5-Fettsäurekette ist in diesen Verbindungen offenbar noch zu kurz, um stabile Mizellen auszubilden. Die Messung des Stearoyl-Derivats **27** lässt erkennen, dass es im Bereich von 0,2–2 μM zur Ausbildung von Partikeln im Puffer kommt. Dieses Ergebnis stimmt mit Literaturwerten überein, da

⁶Die praktischen Arbeiten aus diesem Abschnitt wurden von B. Strehlow, AG Bakowsky, Institut für Pharmazeutische Technologie, Universität Marburg, durchgeführt.

⁷Herrenberg, Deutschland.

2 Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 2.9: Streulichtmessung von Fettsäurederivaten in Puffer. Abhängig von der Anzahl streuender Partikel im Bereich von 100–3000 nm im Puffer erhöht sich die Intensität des gestreuten Lichts.

-- Nullwert des reinen Puffers,

● Acetyl-RVR-4-Amba (**19**),

○ Octanoyl-RVR-4-Amba (**22**),

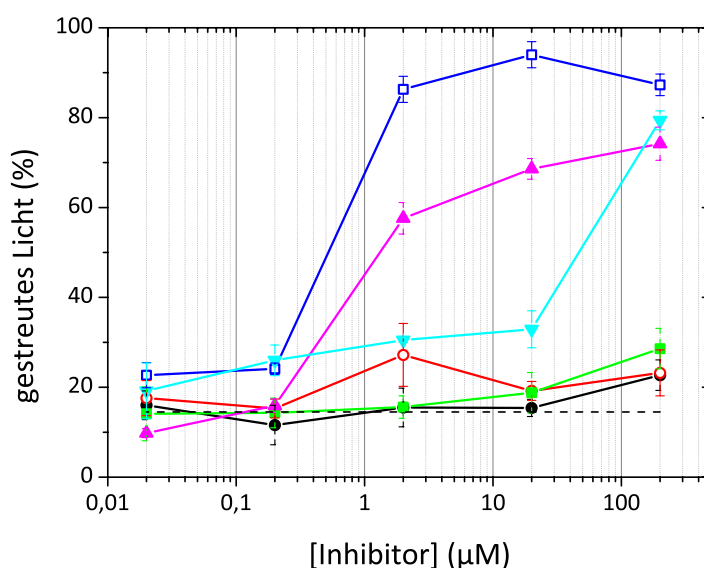
■ Decanoyl-RVR-4-Amba (**23**),

□ Stearoyl-RVR-4-Amba (**27**),

▲ Olenoyl-RVR-4-Amba (**29**),

▼ Linoyl-RVR-4-Amba (**30**).

Messungen erfolgten in den Konzentrationen 0,02, 0,2, 2, 20 und 200 μM .



bereits für eine Serie von Peptiden mit einem N-terminalen Stearoyl-Rest eine CMC von 0,9 μM bestimmt wurde [126]. Auch das Olenoyl-Derivat **29** mit einer Doppelbindung in der Kette bildet mizelläre Strukturen, wobei die Intensität des gestreuten Lichtes jedoch geringer ist. Man kann daraus schließen, dass bei den gewählten Konzentrationen von diesem Inhibitor insgesamt eine geringere Anzahl von Partikeln gebildet wird. Die Einführung einer zweiten Doppelbindung in die C18-Kette (Linoyl-RVR-4-Amba, **30**) führt erst zu einer Partikelbildung ab einer Konzentration $> 20 \mu\text{M}$. Dies bestätigt die Vermutung aus den Inhibitormessungen, dass dieser Inhibitor keine Mizellen in den verwendeten Konzentrationsbereichen ausbildet (lineare Kurven in der Dixon-Auftragung) und deshalb als normaler, reversibel bindender Inhibitor auswertbar ist.

Die Ergebnisse der Partikelgrößenbestimmungen erklären jedoch nicht, warum die Inhibitoren **26** und **27** bei niedrigen Konzentrationen nur eine sehr geringe Hemmwirkung aufweisen. Es konnten erst ab einer Konzentration von 2 μM Partikel in den Pufferlösungen nachgewiesen werden. Bei Messungen in Konzentrationen, die weit unterhalb dieses Wertes und der aus der Literatur bekannten CMC für ähnliche Derivate von 0,9 μM durchgeführt wurden, konnte aber keine ausreichende inhibitorische Aktivität nachgewiesen werden. Dies kann nicht mit dem Vorhandensein von Mizellen erklärt werden. Eine unspezifische Bindung an die Oberfläche des Furins oder an die Wände von Reaktionsgefäßen sowie die Bindung an Bestandteile des Puffers, z. B. Triton-X-100, könnte aber für die Reduktion der effektiven InhibitorKonzentration in Lösung verantwortlich sein, die zu der beobachteten geringen Hemmwirkung führt. Die Bildung von Mizellen in Lösung

kann aber der Grund für die Abweichung in der Linearität in der Dixon-Auftragung sein, da solche Partikel den Hemmmechanismus beeinflussen können.

Für den weiteren Verlauf der Optimierung der Peptidmimetika wurden die Palmitoyl-, Stearoyl- und Olenoyl-Inhibitoren daher nicht weiter eingesetzt, da sie zum einen eine reduzierte Hemmwirkung besitzen und zum anderen die beschriebenen Probleme bei der Auswertung der Messungen auftraten. Zudem wurden für die Verbindungen **27** und **29** bei späteren Untersuchungen zytotoxische Effekte in Zellkulturen gefunden (siehe Abschnitt [2.8.1 auf Seite 60](#)).

2.2.3 Hydrophobe aromatische P5-Derivate

Neben den bereits beschriebenen Acyl-Resten wurden in P5-Position weitere, sterisch anspruchsvolle, hydrophobe Reste eingebaut, um deren Effekt auf die Furinhemmung zu untersuchen. Hierzu wurden Fmoc-, Cbz-, Tosyl- und 3,4-Dichlorphenylacetyl-Gruppen verwendet. Die erhaltenen K_i -Werte sind in der Tabelle [2.2](#) aufgeführt und in Abbildung [2.13 auf Seite 44](#) zusammen mit weiteren P5-Derivaten graphisch dargestellt. Sämtliche Derivate (**41–44**) hemmen Furin mit K_i -Werten < 10 nM, sind aber etwas weniger wirksam als Inhibitor **17**, Phac-RVR-4-Amba. Die sterisch relativ anspruchsvolle Fmoc-Gruppe scheint dabei wenig toleriert zu werden und weist die schwächste Hemmwirkung auf. Da für diese Verbindungen keine positiven Effekte auf die inhibitorische Wirkung festgestellt wurden, sind im Verlauf der folgenden Synthesen diese P5-Reste nicht weiter eingesetzt worden.

2.2.4 Basische P5-Derivate

Synthese der Verbindungen **31–40**

Es ist bekannt, dass viele Furinsubstrate auch im Bereich von P5–P8 basische Aminosäurereste akzeptieren [[58](#)]. Daher wurde eine weitere Inhibitorserie mit basischen P5-Resten synthetisiert. Obwohl dadurch die generelle Basizität weiter erhöht wird, gibt es Beispiele dafür, dass solche Strukturtypen eine relativ hohe Zellgängigkeit aufweisen können, z. B. das nona-D-Arginin oder Sequenzen des zellpenetrierenden HIV-Tat-Proteins [[127–130](#)], die multiple basische Reste enthalten. Weiterhin ist bekannt, dass Furin durch viele multibasische Verbindungen effektiv gehemmt wird [[80, 81, 95](#)]. Die Synthese der Verbindungen **31–40** erfolgte entsprechend der Strategie für Inhibitor **17** wie in Abbildung [2.2 auf Seite 26](#) bereits gezeigt. Für den Einbau des P5-Restes wurde die N-terminal Boc-geschützte Aminovalerian- und Aminocaprinsäure sowie die entsprechenden *o*-, *m*- und *p*-(Aminomethyl)phenylelessigsäure-Derivate eingesetzt. Nach Ab-

spaltung der Rohpeptide vom Harz unter Erhalt der Seitenkettenschutzgruppen wurde 4-(Aminomethyl)benzamidin gekoppelt und anschließend wurden alle Schutzgruppen entfernt. Gegebenenfalls wurde die N-terminale Aminogruppe noch guanyliert. Die synthetisierten Strukturen mit den K_i -Werten sind in Tabelle 2.2 gezeigt.

Erste Untersuchungen zur Furinhemmung durch diese Verbindungen zeigten eine zu starke Wirksamkeit im Standard-Enzymtest bei Einsatz von Inhibitorkonzentrationen, die mindestens 10-fach über der berechneten Enzymkonzentration lagen. Deshalb mussten die kinetischen Messungen unter „tight-binding“-Bedingungen durchgeführt werden, das bedeutet bei vergleichbaren Enzym- und Inhibitorkonzentrationen [131, 132]. Für die Berechnung der Hemmkonstanten unter diesen Bedingungen ist die Kenntnis der aktiven Enzymkonzentration erforderlich, die normalerweise durch „active-site“-Titration bestimmt wird.

„Active-site“-Titration und „tight-binding“-Kinetik

Die Enzymkonzentration wird üblicherweise durch eine „burst“-Titration bestimmt, bei der das Enzym in einem ersten, schnellen Schritt ein geeignetes Substrat umsetzt. In den meisten Fällen werden dafür Ester-Substrate eingesetzt, die ein relativ stabiles Acyl-Enzym ausbilden. Um ein ausreichendes Messsignal für den „burst“ zu erhalten, müssen genügend hohe Enzymkonzentrationen für die Titration eingesetzt werden. Im Anschluss an die Acylierung kommt es zu einer langsamen Deacylierung und in der Folge zu einem konstanten Substratumsatz. Basierend auf den Messdaten des Substratumsatzes im linearen Bereich der Kurve kann eine Ausgleichsgerade berechnet werden, die auf die Ordinate extrapoliert wird. Aus dem Schnittpunkt mit der y-Achse kann dann die Enzymkonzentration ermittelt werden [133–135].

Für Proproteinkonvertasen sind keine geeigneten Ester-Derivate für die „active-site“-Titration bekannt. Jedoch wurde für die PCs Furin und Kex2 bereits eine auf der Verwendung von AMC-Substraten basierende „active-site“-Titration unter „stopped-flow“-Bedingungen beschrieben, die eine relativ hohe Enzymkonzentration erfordert [136, 137]. Aufgrund der eingeschränkten Menge Furin, die zur Verfügung stand, wurde eine andere Methode unter Verwendung des irreversibel bindenden Chlormethylketons, Dec-RVKR-CMK, eingesetzt, die bereits früher für Furin beschrieben wurde [76]. Dabei wird Furin mit verschiedenen, genau bekannten Konzentrationen des Inhibitors größer und kleiner der vermuteten Enzymkonzentration vorinkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten die Restaktivität des Enzyms mittels eines fluorogenen Substrates bestimmt. Die erhaltenen Messpunkte werden im linearen Bereich an eine Ausgleichsgerade angepasst und

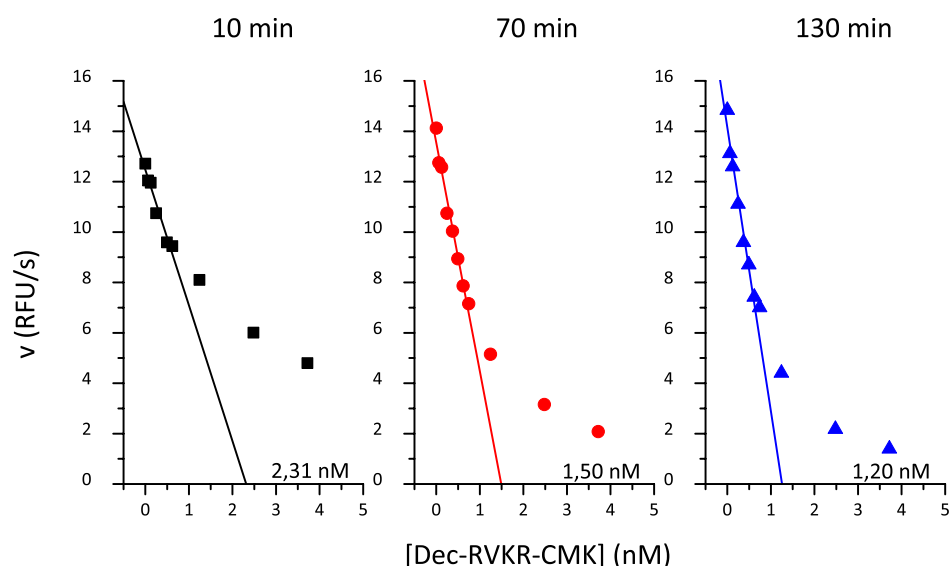


Abbildung 2.10: Bestimmung der Furin-Konzentration durch „active-site“-Titration mit dem irreversiblen Inhibitor Dec-RVKR-CMK. Die Schnittpunkte mit der Abszisse sind in den Graphen angegeben. ■ Messung nach 10 min, ● Messung nach 70 min, ▲ Messung nach 130 min.

durch Extrapolation auf die Abszisse wird die Konzentration des aktiven Enzyms aus dem Schnittpunkt erhalten (Abb. 2.10). Dang und Di Cera verwendeten diese Methode bereits im Jahr 1994 zur Bestimmung der Thrombinkonzentration mittels des sehr wirksamen Inhibitors Hirudin [138].

Die so ermittelte Enzymkonzentration hing unter den gewählten Messbedingungen (siehe Experimentalteil, Abschnitt 4.2.3 auf Seite 84) eindeutig von der Vorinkubationszeit ab (siehe Abbildungen 2.11 auf der nächsten Seite und 2.10). Damit ist die in der Literatur beschriebene Zeit von 30 min Vorinkubation offenbar nicht ausreichend. Erst nach ca. 2 h wurde ein relativ konstanter Wert von $1,2 \text{ nM} \pm 0,1$ erreicht. Mit dieser ermittelten Enzymkonzentration konnte jedoch keine zufriedenstellende Anpassung der Messdaten an die Gleichung für die Bestimmung der apparenten K_{i*} -Werte unter „tight-binding“-Bedingungen (Gleichung (4.3) auf Seite 84) erhalten werden. Deshalb wurde vermutet, dass die bestimmte Enzymkonzentration durch Ungenauigkeiten in der Inhibitorkonzentration unter den gewählten Messbedingungen verfälscht wird. Es ist bekannt, dass andere peptidische Chlormethylketone unter physiologischen pH-Bedingungen bei Messungen über längere Zeiträume instabil sind [105].

Aufgrund der beobachteten Probleme bei der Bestimmung der Enzymkonzentration und der vermuteten Instabilität des hier verwendeten CMK-Inhibitors wurde dessen Stabilität in Messpuffer bei pH 7,0 und RT über 24 h untersucht. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben aus der Pufferlösung entnommen und mittels HPLC analysiert. Die Auf-

2 Ergebnisse und Diskussion

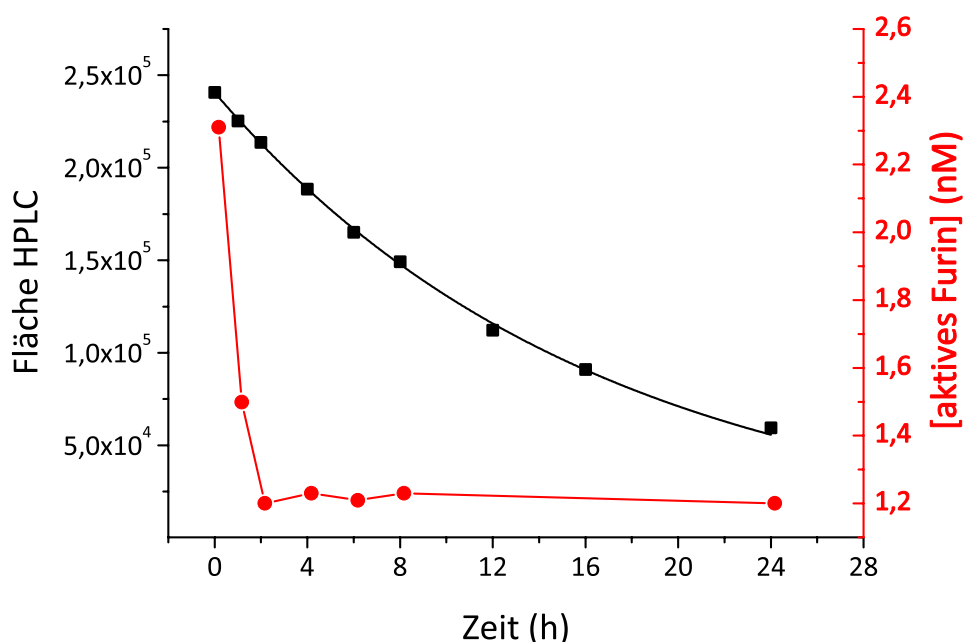


Abbildung 2.11: Ergebnisse der „active-site“-Titration von Furin mit dem irreversiblen Inhibitor Dec-RVKR-CMK. ■ HPLC Stabilitätsuntersuchung des Inhibitors in Messpuffer über 24 h bei RT. Die Messdaten wurden an Gleichung (2.2) angepasst, als Ergebnis wurde eine Geschwindigkeitskonstante von $k = 0,061 \text{ h}^{-1}$ erhalten, ● Auftragung der durch „active-site“-Titration bestimmten Furin-Konzentrationen nach verschiedenen Vorinkubationszeiten (aus Abb. 2.10) gegen den Messzeitpunkt (rechte y-Achse). Die Reaktion des Enzyms mit dem Inhibitor ist nach ca. 2 h vollständig ($1,21 \pm 0,1 \text{ nM}$).

tragung der erhaltenen Flächen des Inhibitorpeaks gegen die Zeit veranschaulicht, dass es im Puffer zu einem langsamen Abbau des Inhibitors kommt (rechte y-Achse, Abb. 2.11). Die Messwerte wurden zusätzlich an eine Geschwindigkeitsgleichung für eine Reaktion erster Ordnung angepasst (Gl. (2.2)). Aus der erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten k konnte eine Halbwertszeit $t_{1/2}$ des Inhibitors von 11,4 h berechnet werden (mit $[I]_0$ als eingesetzter Ausgangskonzentration des Inhibitors und $[I]_t$ als Inhibitorkonzentration zum Zeitpunkt t).

$$[I]_t = [I]_0 \cdot e^{-k \cdot t} \quad (2.2)$$

mit $t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k}$

Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, dass diese Methode nur eine ungenaue Vorstellung der tatsächlichen Enzymkonzentration im Ansatz liefert. Daher wurde die Gleichung (4.3) für die Bestimmung der apparenten K_i^* -Werte unter „tight-binding“-Bedingungen leicht modifiziert, indem die eingesetzte Enzymkonzentration mit einem

Korrekturfaktor x versehen wurde (Gleichung (4.4) auf Seite 85). Diese Art der Anpassung wurde in leicht modifizierter Form für die Bestimmung des apparenten K_i^* -Wertes des Thrombin-Inhibitors Hirudin bereits verwendet. In diesem Fall war die tatsächliche Hirudin-Konzentration nur ungenau bekannt und wurde darum mit einem zusätzlichen Korrekturfaktor versehen [139]. Durch Anpassung der Messdaten an Gleichung (4.4) unter Verwendung der aus der Proteinbestimmung berechneten Enzymkonzentration von $0,95 \text{ nM}^8$ wurde für x ein Wert von ungefähr 1 erhalten. Dies entspricht demzufolge einer aktiven Enzymkonzentration von ca. $0,95 \text{ nM}$ im Ansatz.

Abbildung 2.12: „Tight-binding“-Auswertung der Inhibitoren **37** und **38**. ● Inhibitor **37**, 3-(Aminomethyl)phenylacetyl-RVR-4-Amba, ■ Inhibitor **38**, 3-(Guanidinomethyl)phenylacetyl-RVR-4-Amba. Die Kurven wurden an Gleichung (4.4) angepasst. Es wurde eine Substratkonzentration von $8,125 \mu\text{M}$ verwendet.

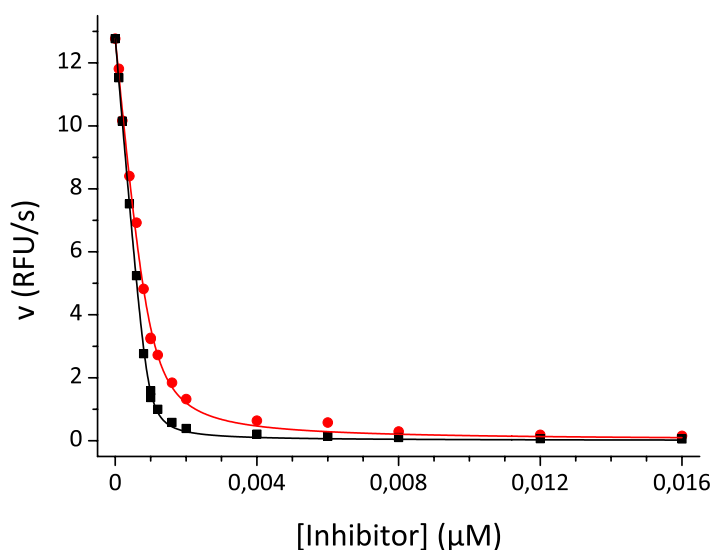


Abbildung 2.12 zeigt eine beispielhafte Auswertung der Inhibitoren **37** und **38** unter Verwendung dieser modifizierten Methode. Die Anpassung der Ausgleichskurven an die Messdaten ist durch Verwendung der Gleichung (4.4) mit einer Enzymkonzentration von $0,95 \text{ nM}$ möglich, während die Anpassung unter Einsatz der ermittelten Enzymkonzentration von $1,2 \text{ nM}$ (bestimmt durch die „active-site“-Titration mit dem CMK-Inhibitor) nicht gelang. Aus dem apparenten K_i^* -Wert kann mit Gleichung (4.5) auf Seite 85 der tatsächliche K_i -Wert berechnet werden.

Die auf diese Art bestimmten K_i -Werte der Verbindungen **31–40** sind in Abbildung 2.13 auf der nächsten Seite graphisch dargestellt. Die Inhibitoren mit linearen Amin- und Guanidin-Gruppen in P5-Position (**31–34**) sind potente Furininhibitoren mit K_i -Werten im Bereich von $0,06$ bis $0,1 \text{ nM}$. Die Derivate mit kürzerer Kette (5 C-Atome) hemmen dabei etwas stärker. Eine zusätzliche Guanylierung konnte den K_i -Wert nochmals leicht verbessern. Von den (Aminomethyl)phenylelessigsäure-Derivaten weist die *ortho*-Verbindung die

⁸Informationen von Iris Lindberg, Institut für Anatomie und Neurobiologie, University of Maryland, Baltimore, MD, USA.

2 Ergebnisse und Diskussion

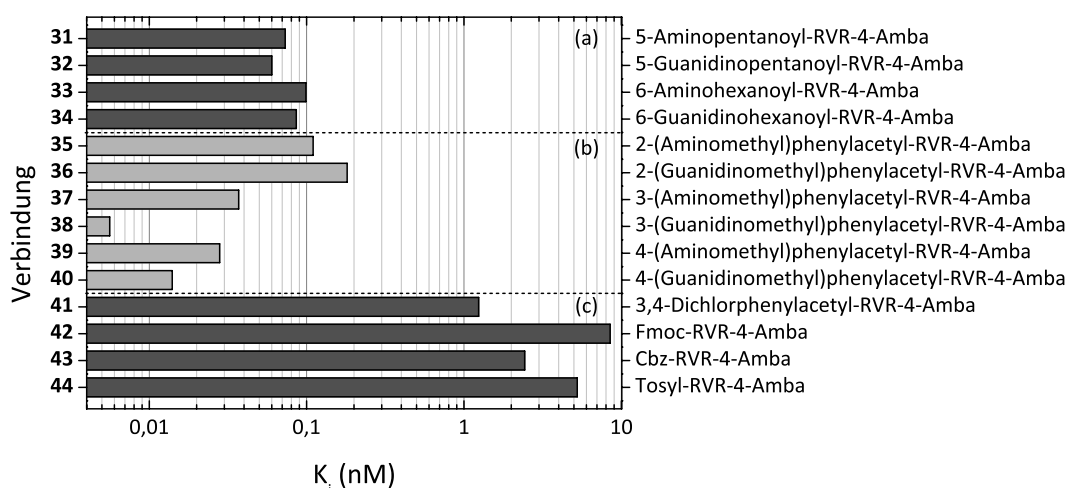


Abbildung 2.13: K_i -Werte basischer und hydrophober P5-Derivate. (a) Derivate mit linearen, basischen Resten in P5-Position. (b) Derivate mit aromatischen, basischen Resten in P5-Position. Die Messungen wurden unter „tight-binding“-Bedingungen durchgeführt. (c) Derivate mit hydrophoben aromatischen Resten in P5-Position. Die Messungen wurden unter Standardbedingungen durchgeführt.

geringste Affinität zu Furin auf. Deren Guanylierung führt zu einer noch schwächeren Hemmung, möglicherweise aufgrund sterischer Probleme. Aus den bereits sehr wirksamen *meta*- und *para*-(Aminomethyl)phenylelessigsäure-Derivaten konnten durch Umwandlung in die entsprechenden Guanidine noch stärkere Furinhemmstoffe erhalten werden (5,6 bzw. 14 pm).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die zusätzliche basische Gruppe in P5-Position einen großen Einfluss auf die Inhibitorkonstante hat. Im Hinblick auf das stark negative Oberflächenpotential des aktiven Zentrums von Furin, wie in der Abbildung für den modellierten Komplex zwischen Inhibitor **74** und Furin zu sehen ist (siehe Abbildung 2.16 auf Seite 54), ist dieses Ergebnis leicht verständlich. Denkbar wäre auch ein reverser Bindungsmodus mit diesen Verbindungen. Die Verteilung der basischen Gruppen auf P1/P2 und P4/P5 mit Valin in P3-Position ähnelt einem symmetrischen Aufbau. Wahrscheinlicher ist aber der bekannte, substratanaloge Bindungsmodus mit dem 4-Amba-Rest in P1-Position, unter Erhalt der aus der Kristallstruktur bekannten, antiparallelen β -Faltblattstruktur (siehe Abbildung 2.17c auf Seite 56). Letztendlich könnte nur eine Kristallstruktur dieser Verbindungen in Furin Aufschluss über den tatsächlichen Bindungsmodus geben. Für den substratanalogen Bindungsmodus spricht allerdings auch die sehr schwache Hemmwirkung der Inhibitoren mit 3- oder 4-(Amidomethyl)benzylamin und -guanidin-Resten in P1-Position (**9**, **10**, **13** und **14**).

2.3 Modifizierung der P3-Position

Obwohl bekannte Substratsequenzen oftmals als Ausgangspunkt für die Entwicklung von Inhibitoren dienen, kann man von diesen Substraten nicht generell Rückschlüsse auf optimale Inhibitorstrukturen ziehen. Analysiert man die Substratsequenzen des Furins, erkennt man keine klare Präferenz für eine Aminosäure in P3-Position. Deshalb wurde diese Position in Inhibitor **17** (Phac-RVR-4-Amba), die nicht unbedingt eine basische Aminosäure erfordert, mit sämtlichen proteinogenen Aminosäuren variiert. Zusätzlich wurde noch ein 2,3-Diaminopropansäure-Rest verwendet, da aus einem Modell des Inhibitors **74** (Dec-RVK-4-Amba, siehe Abschnitt 2.6 auf Seite 53) in Maus-Furin ersichtlich war, dass in der S3-Tasche des Furins ein Glutamat-Rest (Glu257) positioniert ist, der mit einer protonierten Aminomethyl-Seitenkette der P3-Aminosäure interagieren könnte. Die K_i -Werte dieser Verbindungen sind als Graph in Abbildung 2.14 dargestellt.

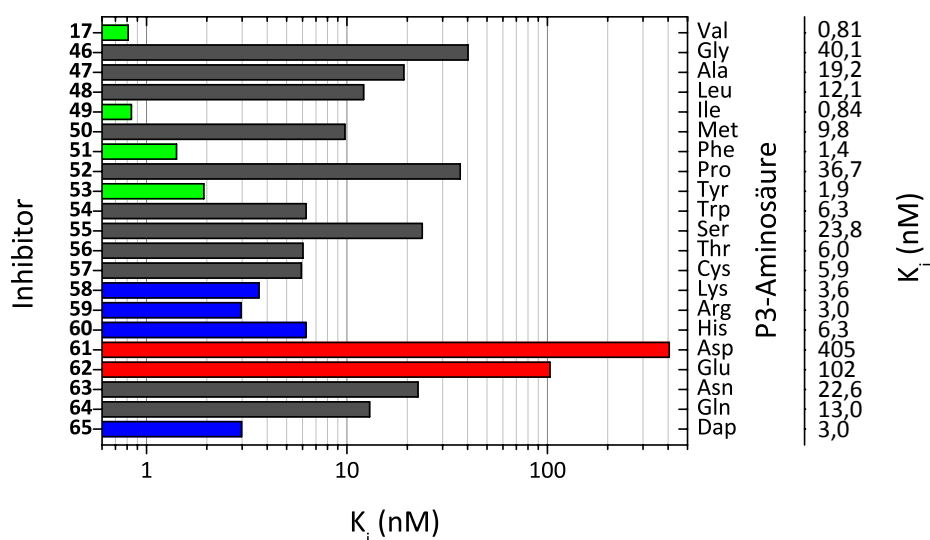


Abbildung 2.14: Hemmung des Furins durch P3-Derivate der allgemeinen Formel Phac-RXR-4-Amba. Die K_i -Werte sind in der rechten Spalte des Graphen angegeben. Die wirksamsten Inhibitoren sind grün (■), die Inhibitoren mit basischen P3-Resten blau (■) und Inhibitoren mit sauren P3-Resten rot gekennzeichnet (■).

Ein Vergleich zeigt, dass die hydrophoben Reste Valin und Isoleucin in P3-Position bevorzugt werden. Erstaunlicherweise hemmt das Leucin-Derivat deutlich schlechter, obwohl es sich nur in der räumlichen Anordnung der Methyl-Gruppe von Isoleucin unterscheidet. Offensichtlich ist der geringe Unterschied in der Seitenkette der P3-Aminosäure dafür verantwortlich. Der Einbau des strukturell isosteren Aparagins führt zu einem Inhibitor (**63**), dessen K_i -Wert vergleichbar zu der Leucin-Verbindung (**48**) ist.

2 Ergebnisse und Diskussion

Im Gegensatz dazu scheint die Methylgruppe in der Seitenkette des Alanins nicht ausreichend zu sein, um einen Effekt auf die Bindungsaffinität zu zeigen. Noch etwas weniger wirksam ist der Glycin-Inhibitor **46**, dem jegliche P3-Seitenkette fehlt. Möglicherweise ist auch die hohe Flexibilität des Glycin-Rückgrates für die geringere Hemmwirkung verantwortlich. Eine reduzierte Hemmwirkung wurde auch für den Prolin-Inhibitor (**52**) gefunden. Im Gegensatz zu allen anderen Aminosäuren kann Prolin keine H-Brückenbindung zum Carbonyl-Sauerstoff des Furin-Restes Gly255 ausbilden, die in der Kristallstruktur mit dem CMK-Inhibitors gefunden wurde, was das antiparallele β -Faltblatt destabilisiert (vgl. Abb. 2.17c auf Seite 56).

Die hydrophoben, aromatischen Phenylalanin- und Tyrosininhibitoren sind nach den Valin- und Isoleucin-Derivaten die wirksamsten Verbindungen. Die Einführung weiterer basischer Reste in der P3-Position wie Arginin, Lysin und Diaminopropansäure hat im Gegensatz zur P5-Position keinen positiven Effekt. Diese Inhibitoren hemmen Furin mit K_i -Werten im Bereich von 2,9 bis 6,4 nM. Die schwächste Hemmwirkung zeigen die Glutamat- und Aspartat-Derivate **61** und **62**. Offenbar werden diese sauren P3-Reste relativ schlecht in der S3-Tasche akzeptiert, da sie vom Glutaminsäure-Rest 257 oder generell vom stark negativ geladenen aktiven Zentrum abgestoßen werden.

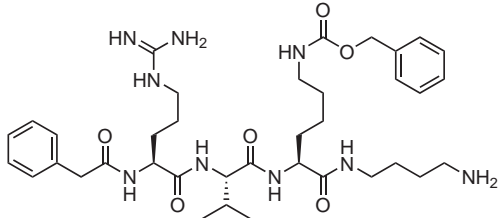
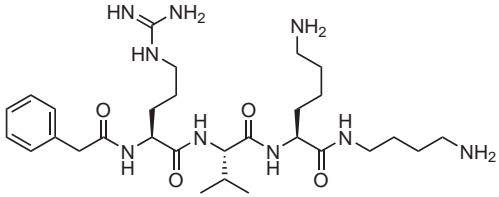
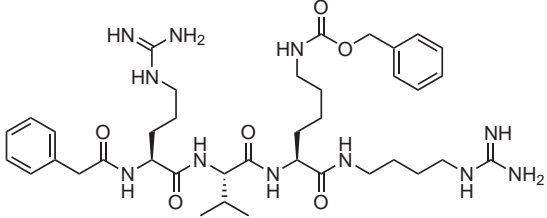
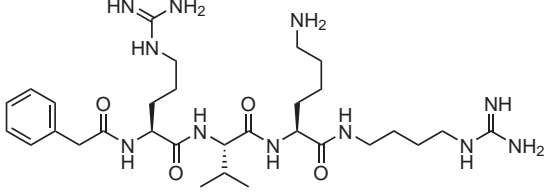
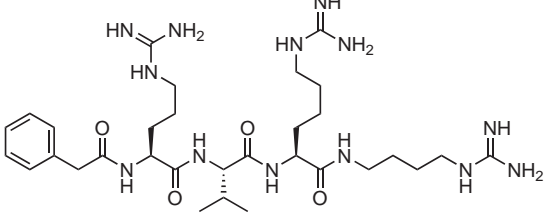
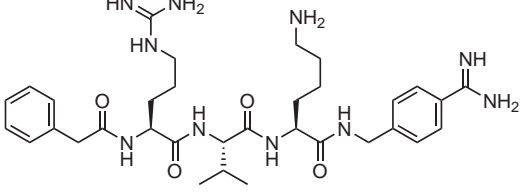
2.4 Weitere Inhibitorstrukturen

2.4.1 Lysin-Derivate

Da in einigen Substratsequenzen der furinartigen Propeptidkonvertasen als P2- und P4-Aminosäure neben Arginin auch Lysin zu finden ist [58], wurden weitere Inhibitoren mit Lysin in diesen Positionen synthetisiert. Durch eine nachfolgende Guanylierung der Lysin-Seitenkette konnte auch ein *homo*-Arginin-Derivat in P2-Position hergestellt werden. Die Strukturen mit den entsprechenden K_i -Werten sind in Tabelle 2.3 zusammengefasst.

Um den Einfluss des Austausches eines Arginins durch Lysin noch zu verdeutlichen, wurden die K_i -Werte dieser Verbindungen als Diagramm dargestellt und einigen bereits beschriebenen Inhibitoren gegenübergestellt (Abb. 2.15 auf Seite 49). Im Allgemeinen sieht man, dass wie schon in Abschnitt 2.1.3 auf Seite 27 beschrieben, die 4-Amidobutylamine und -guanidine im Gegensatz zu den 4-Amba-Derivaten in P1-Position weniger wirksam sind. Tauscht man in P2-Position Arginin gegen Lysin aus, so ist aus dem direkten Vergleich der K_i -Werte der Verbindungen **67/7**, **69/11**, **71/17** sowie **75/65** ersichtlich, dass dies keinen gravierenden Einfluss auf die Inhibitorwirkung hat. Die Aktivitäten der P2-Lysin- und Arginin-Derivate liegen annähernd im gleichen Bereich.

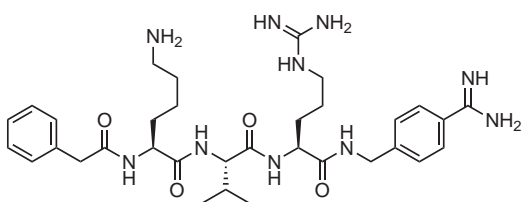
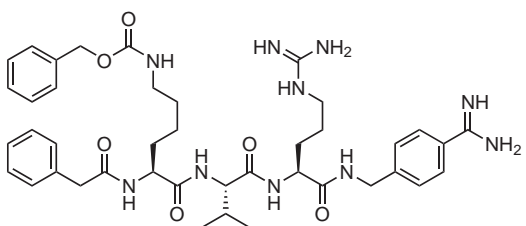
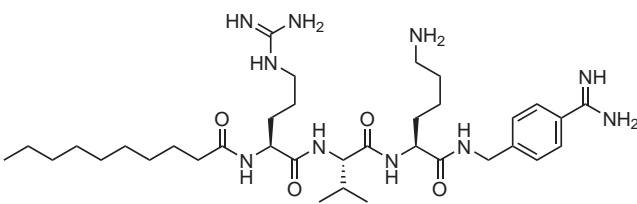
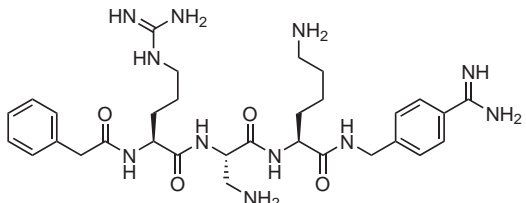
Tabelle 2.3: K_i -Werte der Lysin-Derivate

Nr.	Struktur	K_i (nM)
66		97250
67		6370
68		3450
69		50
70		43
71		1,5

Fortsetzung auf der nächsten Seite...

2 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 2.3: K_i -Werte der Lysin-Derivate, Fortsetzung

Nr.	Struktur	K_i (nM)
72		285
73		702
74		3,3
75		3,7

Die Inhibitoren mit Cbz-Schutz am Lysin in P2-Position zeigen allerdings deutlich schlechtere Aktivitäten als die freien Lysin-Derivate. Dieses Ergebnis ist nicht überraschend, da aus der Kristallstruktur des substratanalogen CMK-Inhibitors in Maus-Furin ersichtlich ist, dass die protonierte Aminogruppe des P2-Lysins zahlreiche Bindungen zum Enzym und zu Wassermolekülen im Kristall ausbildet. Der Verlust der basischen Gruppe wird deshalb nicht toleriert.

Die Verlängerung der Seitenkette eines Arginins zu einem *homo*-Arginin durch Guanynylierung des Lysins führt zu einem ähnlichen K_i -Wert wie die entsprechende Lysin- und Arginin-Variante, offenbar wird die im Vergleich zum Arginin-Derivat um eine CH_2 -Gruppe verlängerte Verbindung durchaus in der S2-Tasche des Enzyms toleriert.

Der Austausch des P4-Arginins durch ein Lysin bewirkt einen drastischen Verlust der inhibitorischen Wirkung um den Faktor von ca. 200. Der Verlust der Affinität ist sogar

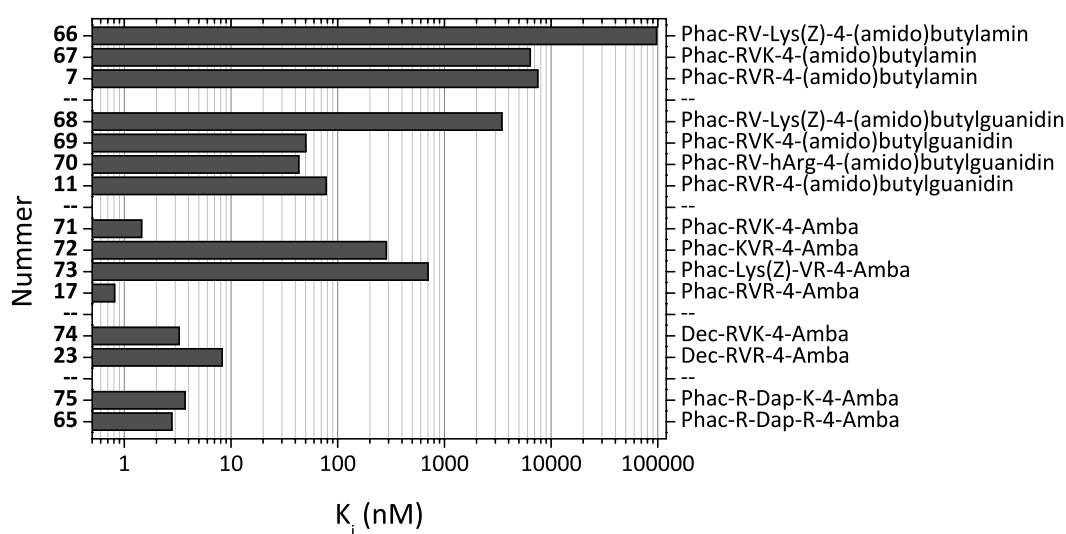


Abbildung 2.15: Vergleich der K_i -Werte von Lysin-Derivaten. Zusätzlich zu den synthetisierten Lysin-Derivaten sind in diesem Graph K_i -Werte von bereits diskutierten Inhibitoren zu Vergleichszwecken aufgeführt.

so stark, dass die Cbz-geschützte Verbindung **73** kaum schwächer als der freie Inhibitor hemmt (Faktor von $\sim 2,5$). Dies zeigt, dass das in P4 positionierte Arginin einen entscheidenden Einfluss auf die Affinität dieser substratanalogen Inhibitoren hat.

2.4.2 Citrullin- und N-Methylarginin-Derivate

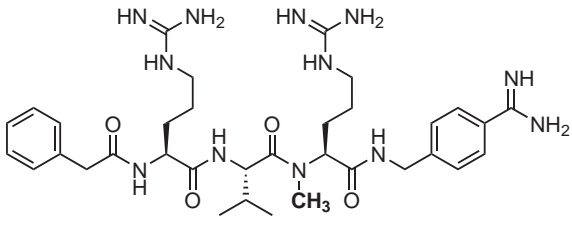
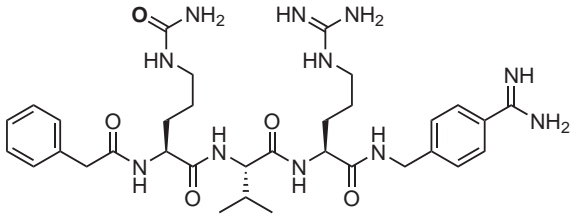
Neben den bereits beschriebenen Inhibitoren wurden zwei weitere Derivate mit einem N-(Methyl)arginin als P2-Rest (**83**) und einem Citrullin-Rest in P4-Position (**84**) synthetisiert (Tab. 2.4 auf der nächsten Seite). Die Seitenkette des Citrullins mit einer endständigen Harnstoffgruppe ist strukturell ähnlich zu der des Arginins, jedoch ungeladen. Es ist zu vermuten, dass eine weniger stark geladene Verbindung möglicherweise besser durch Membranen diffundieren kann. Allerdings kommt es durch den Einbau des Citrullins zu einem ca. 300-fachen Affinitätsverlust für Furin. Dies ist vergleichbar mit der Einführung des Lysins in Verbindung **72** und des Lys(Z) in Inhibitor **73** (siehe voriger Abschnitt). Offenbar ist die terminale Harnstoffstruktur nicht in der Lage, das komplexe Bindungsnetzwerk auszubilden, wie es später für das P4-Arg-Derivat beschrieben ist (siehe Abb. 2.17d auf Seite 56). Auf die Einführung des Citrullins in P2-Position wurde verzichtet, da auch dort Furin zwingend einen basischen Aminosäurerest erfordert.

Es sind viele Methoden bekannt, um die Abbaustabilität von Peptidstrukturen zu verbessern. Dies kann durch Schutz oder Eliminierung der N-terminalen Amino- oder C-terminalen Carboxylgruppe, durch Einbau von D-Aminosäuren, durch Zyklisierungen

2 Ergebnisse und Diskussion

oder durch Modifikation der Peptidbindung erreicht werden. Auch die Methylierung des Amid-Stickstoffs durch die Einführung von N-Methyl-Aminosäuren erhöht in vielen Fällen die Stabilität *in vivo*. Beispielsweise konnten die k_{cat}/K_m -Werte für die Spaltung des Ac-N-(Methyl)tyrosinmethylesters durch Chymotrypsin im Vergleich zu Ac-Tyr-OMe um den Faktor 100 000 reduziert [140] oder der Abbau von bivalenten Thrombininhibitoren durch Einführung von N-(Methyl)arginin in P1-Position verhindert werden [141]. Deshalb wurde versucht, im Vergleich zu Inhibitor 17 in P2-Position einen N-(Methyl)arginin-Rest einzubauen.

Tabelle 2.4: Citrullin- und N-Methylarginin-Derivate

Nr.	Struktur	K _i (nM)
83		141,9
84		238,2

Diese Modifizierung bewirkte allerdings einen ca. 175-fachen Affinitätsverlust, obwohl aus dem Strukturmodell des Inhibitors 74 [111] nicht ersichtlich ist, warum es zu einem so starken Verlust an Bindungsaffinität kommt. Die P2-Amid-NH-Gruppe ist weder in einer Bindung zu Furin noch zu einem Wassermolekül oder in eine intramolekulare H-Brücke involviert. Da aber das P4-Amid-NH an ein Netzwerk von Wassermolekülen gebunden ist, wurde auf den Einbau von N-(Methyl)arginin in der P4-Position verzichtet.

2.4.3 D-Arginin-Derivate

Im Laufe der Optimierung dieser substratanalogen Inhibitorstruktur wurden einige Derivate mit D-Aminosäuren in verschiedenen Positionen hergestellt, dies hatte mehrere Gründe: Prinzipiell ist durch den Einbau von D-Aminosäuren zu erwarten, dass solche

Inhibitoren im Vergleich zu den reinen L-Derivaten stabiler gegen proteolytischen Abbau sind. Des Weiteren gibt es zahlreiche substratanaloge Inhibitoren, vor allem für trypsinartige Serinproteasen, die durch Einbau geeigneter D-Aminosäuren in P3-Position deutlich aktiver wurden. Auch einer der wirksamsten bisher beschriebenen Furininhibitoren, nona-D-Arg, ist aus D-Aminosäuren aufgebaut. Obwohl aufgrund der bekannten Kristallstruktur vermutet wurde, dass die hier beschriebenen Furininhibitoren mit D-Aminosäuren eine schwächere Hemmwirkung haben, wurden sie bewusst synthetisiert, um auch Referenzverbindungen für Untersuchungen in Zellkulturen zu erhalten. Im Vergleich zu den reinen L-Verbindungen haben diese Inhibitoren vergleichbare physiko-chemische Eigenschaften, dadurch können spezifische von unspezifischen Effekten unterschieden werden.

Zunächst wurde in der P3-Position anstelle von Valin ein D-Arginin eingebaut und auf die basische P4-Aminosäure verzichtet, um zu untersuchen, ob eine Besetzung der S4-Tasche durch die veränderte Konfiguration möglich ist, so wie es in vielen Fällen für Inhibitoren trypsinartiger Serinproteasen der Fall ist [142, 143].

Die so erhaltene Verbindung Phac-rR-4-Amba⁹ (**76**) hemmt Furin nur mit einem K_i -Wert von 3,2 μM , was darauf schließen lässt, dass eine Adressierung der S4-Tasche nicht gelingt. Im Falle des Furins existiert über dem Trp254 aufgrund der Seitenkette des Leu227 auch keine freie Bindetasche, wie sie in vielen trypsinartigen Serinproteasen vorhanden ist. Der zusätzliche Einbau des Valins in P4-Position bei Inhibitor Phac-VrR-4-Amba (**77**) bewirkt keine Verbesserung der Aktivität; die Verbindung ist mit einem K_i -Wert von 7,34 μM noch schwächer wirksam.

Ebenso wird der Austausch des Arginins durch D-Arginin in P4-Position nicht toleriert. dies zeigt sich bei der Verbindung Phac-rVR-4-Amba (**78**), welche Furin mit einem K_i -Wert von 0,54 μM inhibiert. Dieser liegt im gleichen Bereich wie der Wert für Verbindung **73** (Phac-Lys(Z)-VR-4-Amba), was darauf hindeutet, dass die Seitenkette des P4-Restes nicht die üblichen Wechselwirkungen in der S4-Tasche eingehen kann. Deshalb sind diese Verbindungen als Referenzinhibitoren für Zellkulturversuche geeignet, da sie strukturell ähnlich zu den wirksamen Inhibitoren sind, aber Furin nur schwach hemmen.

2.5 Hemmung anderer Proproteinkonvertasen

Obwohl die furinartigen PCs geringe Unterschiede in ihren Substraterkennungs- und Spaltmustern zeigen [58], besitzen sie dennoch alle eine Präferenz für multibasische Spaltsequenzen. Deshalb wurde erwartet, dass auch andere PCs durch die hier beschrie-

⁹D-Aminosäuren werden im Einbuchstaben-Code mit kleinen Buchstaben gekennzeichnet.

2 Ergebnisse und Diskussion

benen Inhibitoren gehemmt werden sollten. Um dies zu prüfen, wurde die Hemmwirkung ausgewählter Inhibitoren auf die humanen PCs *hPACE4*, *hPC5/6*, *hPC7*, *hPC1/3* und *hPC2* in der Gruppe von Robert Day¹⁰ bestimmt. Dazu wurden die in P5-Position variierten Derivate Acetyl-, Phenylacetyl- und Decanoyl-RVR-4-Amba (**19**, **17** und **23**) sowie die zusätzlichen P1-Derivate Phac-RVR-Agmatin (**11**) und Phac-RVR-4-(amidomethyl)-N-amidinopiperidin (**16**) ausgewählt. Unter den in P1-Position modifizierten Derivaten zeigte Inhibitor **17** die mit Abstand stärkste Furinhemmung, die Inhibitoren **11** und **16** waren ca. 80× weniger wirksam. Der Inhibitor **23** sollte den Effekt einer länger-kettigen Fettsäure in P5-Position auf die Hemmung der anderen PCs im Vergleich zum Acetyl-Derivat (Inhibitor **19**) zeigen. Zusätzlich gestattet Inhibitor **19** im Vergleich zu Inhibitor **17** den Einfluss der zusätzlichen Phenyl-Gruppe im P5-Rest auf die PC-Hemmung zu ermitteln.

Neben den PCs wurden auch die K_i -Werte für die Proteasen Thrombin, Plasmin und Faktor Xa bestimmt, die beispielhaft für die Familie der trypsinartigen Serinproteasen ausgewählt wurden und wichtige Enzyme der Blutgerinnungskaskade sowie der Fibrinolyse sind. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 2.5 zusammengefasst.

Tabelle 2.5: Hemmung verschiedener Proproteinkonvertasen durch ausgewählte Inhibitoren. Die Bestimmung der K_i -Werte für die PCs (außer Furin) erfolgte durch die AG Day, Universität Sherbrook, Kanada [111].

Inhibitor	K_i (nM)				
	11	16	17	19	23
Furin	78	53	0,81	1	1,6
<i>hPACE4</i>	42	67	0,6	2,4	3
<i>hPC5/6</i>	85	173	1,6	3,6	6,3
<i>hPC7</i>	$> 10^4$	$> 10^4$	6154	5131	968
<i>hPC1/3</i>	53	70	0,75	1,7	3,65
<i>hPC2</i>	$> 10^4$	$> 10^4$	312	1388	55
Thrombin	102000	50000	23000	nb ^a	nb
FXa	83000	123000	4000	nb	nb
Plasmin	97000	$> 10^6$	6000	nb	nb

^a nb: nicht bestimmt

Wie erwartet, wurden einige andere PCs durch die untersuchten Inhibitoren in einem ähnlichen Bereich gehemmt wie Furin. Deutlich weniger beeinflusst wurden die Konvertasen *hPC7* und *hPC2*. Interessanterweise konnte für diese Enzyme die stärkste Hemmung durch den decanoylierten Inhibitor **23** erzielt werden, während sonst immer das

¹⁰University of Sherbrook, Quebec, Kanada.

Phenylacetyl-Derivat am wirksamsten ist. Die untersuchten Inhibitoren zeigen dagegen nur eine vernachlässigbare Wirkung auf die trypsinartigen Serinproteasen.

Die geringe Selektivität der getesteten Inhibitoren in der Gruppe der PCs könnte einerseits ein Nachteil, andererseits auch von Vorteil für die weitere Entwicklung von Wirkstoffen sein. Normalerweise erweist sich die weitere Entwicklung von unselektiven Inhibitoren als schwierig, da gleichzeitig mehrere physiologische Prozesse beeinflusst werden und dadurch mit Nebenwirkungen zu rechnen ist. Allerdings werden die furinartigen PCs in Zellen nebeneinander exprimiert und sind teilweise in ihren Funktionen in der Zelle redundant [39, 43]. Deshalb wäre denkbar, dass nur die selektive Hemmung des Furins möglicherweise nicht ausreicht, da alternativ eine andere PC die relevanten Furinsubstrate spalten könnte. Die geringe Affinität zu den ausgesuchten trypsinartigen Serinproteasen ist dagegen ein eindeutiger Vorteil, um das empfindliche Gleichgewicht zwischen der Hämostase und der Fibrinolyse aufrechtzuerhalten.

Wie bereits diskutiert, lässt sich der Unterschied in der Affinität wahrscheinlich mit verschiedenen Anforderungen an die Konfiguration der P3-Aminosäure begründen. In den meisten wirksamen substratanalogen Inhibitoren trypsinartiger Serinproteasen wird eine D-Aminosäure in P3-Position benötigt, während die hier vorgestellten PC-Inhibitoren an dieser Position eine L-Aminosäure erfordern.

2.6 Modellierter Komplex des Inhibitors 74 in Furin

Um eine Vorstellung über den Bindungsmodus des 4-(Amidino)benzylamid-Restes in der S1-Tasche von Furin zu bekommen, wurde der Komplex des Inhibitors Dec-RVK-4-Amba (74) in Maus-Furin modelliert.¹¹ Ausgangspunkt war die bekannte Kristallstruktur von Maus-Furin mit dem irreversibel bindenden Inhibitor Dec-RVKR-CMK (pdb-Eintrag 1p8j [46]). Dabei wurde nur das Arginyl-Chlormethylketon-Segment durch 4-Amidinobenzylamid ersetzt, alle anderen Teile des Inhibitors (P5–P2) blieben unverändert. Danach erfolgte eine Energieminimierung des manuell eingepassten Inhibitors durch das Programm MAIN [144], unter Verwendung eines Kraftfeldes nach Engh und Huber [145]. Die Amidino-Gruppe wurde dabei koplanar mit dem Benzylring gehalten und die Koordinaten des Ca²⁺-Ions am Boden der S1-Tasche des Enzyms fixiert. Da sich nur drei Aminosäuren zwischen Maus-Furin und *h*-Furin unterscheiden, wobei keine in der Nähe des katalytischen Zentrums lokalisiert ist, sollte das Modell des Komplexes zu-

¹¹Das Strukturmodell von Furin mit Inhibitor 74 wurde von Manuel E. Than, Leibnitz Institut für Altersforschung, Fritz Lipmann Institut, Jena, angefertigt.

2 Ergebnisse und Diskussion

mindest für diesen Bereich des *h*-Furins repräsentativ sein. Das katalytische Zentrum des Enzyms mit dem gebundenen Inhibitor ist als Stereobild in Abbildung 2.16 dargestellt.

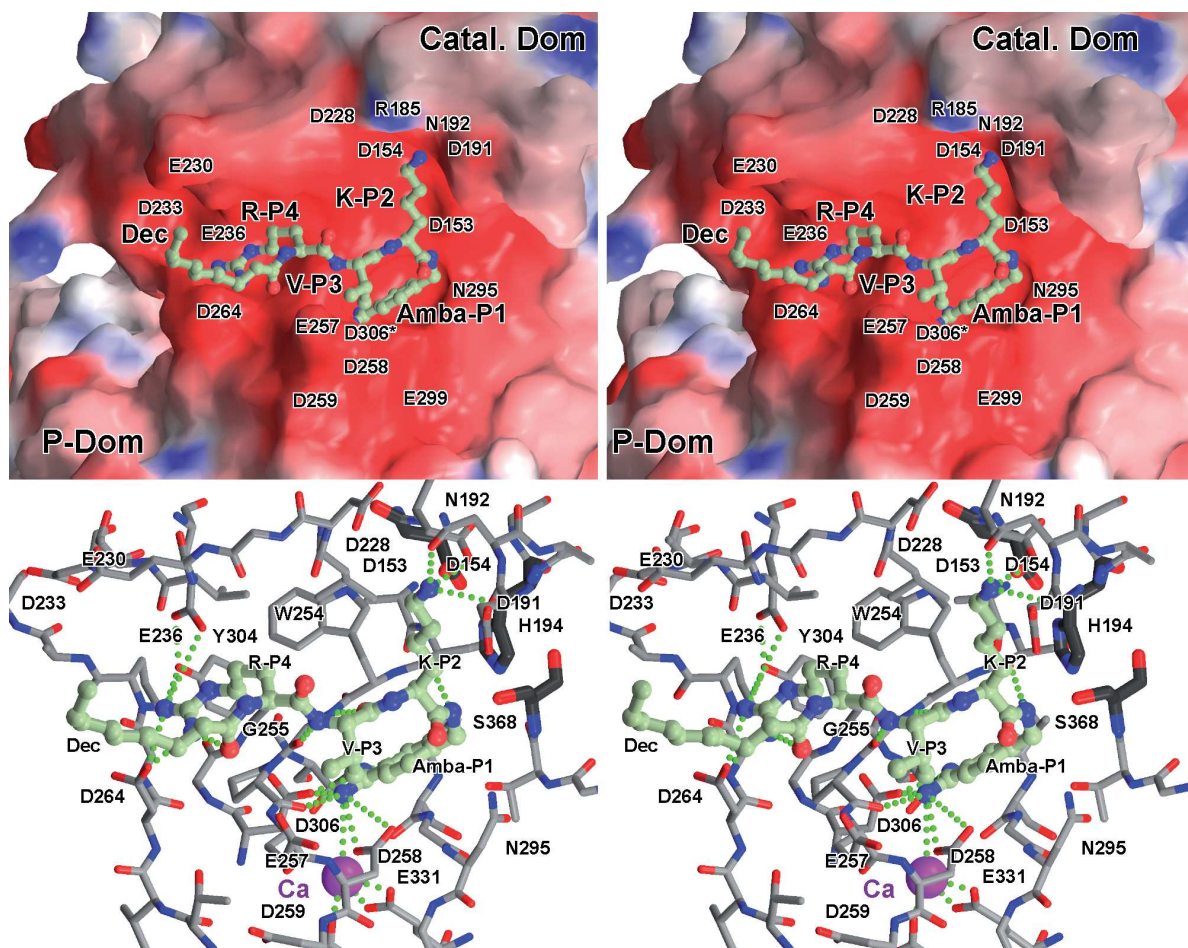


Abbildung 2.16: Stereobild des modellierten Komplexes aus Inhibitor 74 in Maus-Furin. Oben: Der Inhibitor (Kugel-Stab-Modell) ist vor der Oberfläche der katalytischen Domäne gezeigt, deren Farbe entspricht dem berechneten negativen (-15 kT/e, rot) und positiven (15 kT/e, blau) elektrostatischen Potential. Die meisten der für das stark negative Oberflächenpotential verantwortlichen, sauren Aminosäuren in der Nähe des katalytischen Zentrums sind beschriftet. Asp306 (*) ist unter der S1-Tasche positioniert und direkt über eine Salzbrücke an die Amidinogruppe des Inhibitors gebunden. Unten: Inhibitor 74 (Kugel-Stab-Modell, Kohlenstoff: hellgrün) in aktivem Zentrum des Furins (Stab-Modell): Kohlenstoff grau, Sauerstoff rot und Stickstoff blau. Katalytische Reste sind als dickere, dunkelgraue Stäbchen und das Calcium-Ion am Boden der S1-Tasche als violette Kugel dargestellt. Wassermoleküle wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit entfernt und nur wichtige Enzymreste, verantwortlich für Wechselwirkungen oder für das negative Oberflächenpotential von Furin, sind beschriftet. Starke Salz- oder H-Brücken sind durch grün-gepunktete Linien dargestellt. Die untere Abbildung wurde im Gegensatz zur Oberen leicht gedreht, um relevante Wechselwirkungen besser darzustellen. Eine PDB-Datei dieses Komplexes ist online erhältlich [111]. Diese Abbildung wurde unter Verwendung von Grasp [146], MolScript [147] und Raster3D [148] von Manuel E. Than, Leibniz Institut für Altersforschung, Fritz Lipmann Institut, Jena, erstellt.

Auf Basis der modellierten Kristallstruktur konnten mehrere Interaktionen zwischen Furin und dem Inhibitor **74** festgestellt werden, wodurch die starke Affinität der 4-Amidinobenzylamid-Inhibitoren zu Furin erklärbar ist. Die einzelnen Bindetaschen sind zur Verdeutlichung dieser Interaktionen in Abbildung [2.17 auf der nächsten Seite](#) nochmals einzeln dargestellt. Die protonierte Amidino-Gruppe des P1-4-Amba-Restes bindet an den Carbonyl-Kohlenstoff des Ala292 und bildet Salzbrücken zu den Carboxyl-Seitenketten von Asp306 und Asp258 aus (Abb. [2.17a](#)). Zusätzlich existiert eine schwache Wasserstoff-Brücke zwischen dem Carbonyl-Sauerstoff des Pro256 und einem Netzwerk von umgebenden Wassermolekülen. Diese bilden mit dem Ca^{2+} als Zentralatom zusammen mit Asp258, Glu331 und Asp301 einen verzerrten, pentagonal-bipyramidalen Komplex. Der Benzyl-Ring des 4-Amba-Restes wird vom Peptidrückgrat von Trp254 und Gly255 auf der einen Seite und von Gly294 und Asn295 auf der anderen Seite ähnlich zum P1-Arginin aus der ursprünglichen Kristallstruktur umgeben. Es werden noch weitere Wasserstoff-Brückenbindungen ausgebildet, die identisch mit der bekannten Röntgenstruktur sind.

Das P2-Lysin bindet an die Carboxyl-Gruppe von Asp154, zum Seitenketten-Amid von Asn192 und schwach zur Carbonyl-Gruppe von Asp191 (Abb. [2.17b](#)). Des Weiteren werden noch H-Brücken zu einem Cluster aus Wassermolekülen gebildet. Der Austausch des Lysins durch Arginin in der P2-Seitenkette könnte durch eine leichte Umordnung dieser Wassermoleküle und möglichen Wechselwirkungen zur Carboxylseitenkette von Asp228 und Asp191 begünstigt werden. Diese Vermutung wird durch den leicht verbesserten K_i -Wert der entsprechenden Verbindung unterstützt (Inhibitor **23**, $K_i = 1,6 \text{ nM}$).

Das Peptid-Rückgrat des P3-Valins bildet ein kurzes, antiparalleles β -Faltblatt zu Gly255 aus (Abb. [2.17c](#)), was an ähnliche Interaktionen zwischen dem D-P3-Rest in trypsinartigen Serinproteasen und deren Rest Gly216 erinnert [[143](#)]. Im Gegensatz dazu ist aber bei Furininhibitoren der P3-Rest in L-Konfiguration zwingend erforderlich, da der Bereich über dem Indol-Ring von Trp254 mit der Seitenkette von Leu227 gefüllt ist und somit nicht von einer P3-Aminosäureseitenkette in D-Konfiguration adressiert werden kann. Die bereits gezeigten Messungen der K_i -Werte von D-Arginin-Derivaten unterstützen diese Vorstellung. Das β -Faltblatt wird noch durch eine zusätzliche H-Brücke zwischen der Amid-NH-Gruppe des P1-4-Amba-Restes und der Carbonylgruppe von Ser253 vervollständigt.

Die P4-Arginin-Guanidinogruppe bildet über mehrere Wasserstoffbrücken einen engen Kontakt zu den Carboxylgruppen von Glu236 und Asp264 sowie zur phenolischen Hydroxygruppe des Tyr308 aus (Abb. [2.17d](#)). Die Carbonylgruppe des P5-Decanoyl-Restes

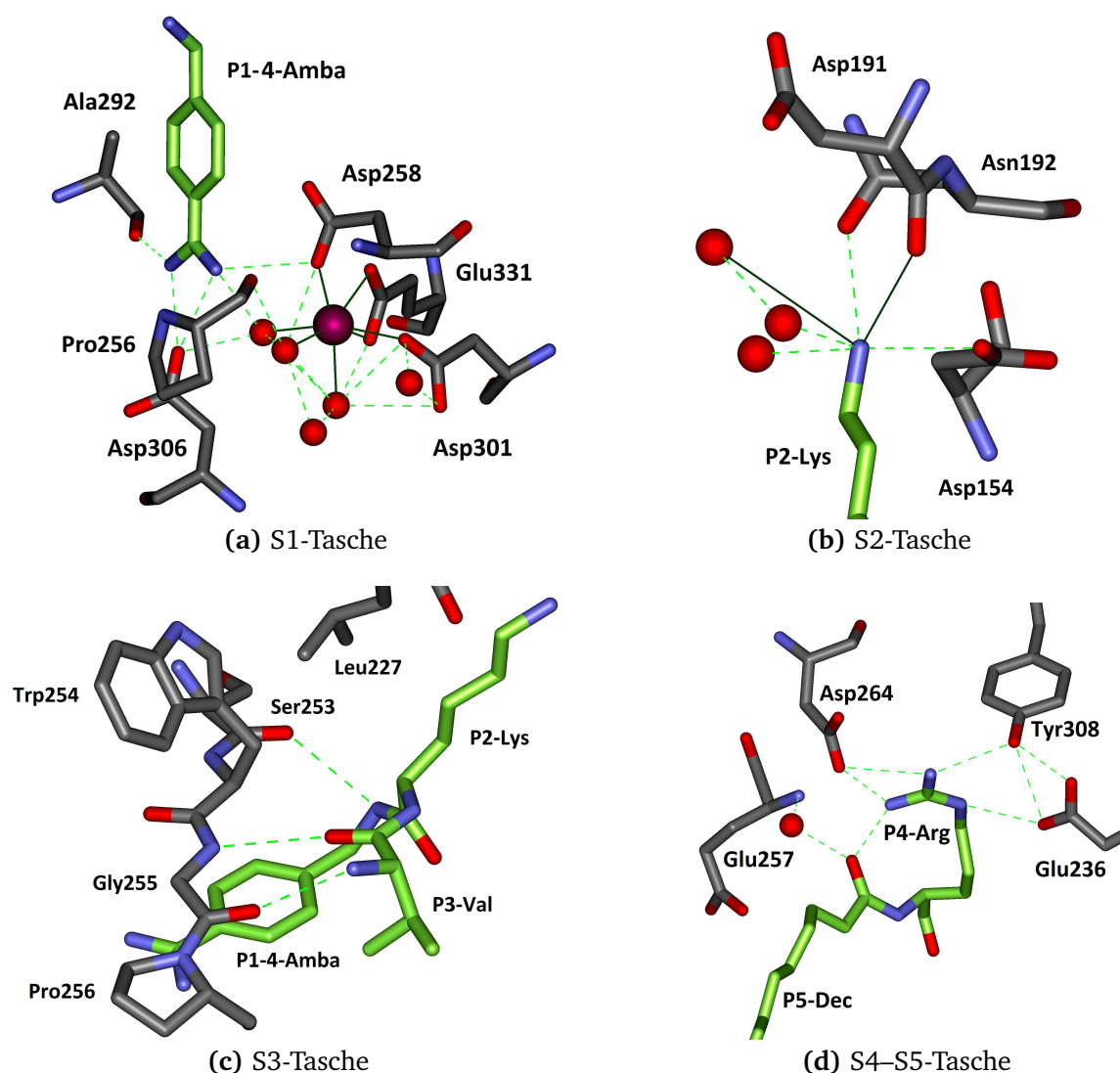


Abbildung 2.17: Darstellung der einzelnen Furinbindetaschen im modellierten Komplex mit Inhibitor 74 (grüne C-Atome). Hellgrün gestrichelte Linien markieren mögliche H-Brückenbindungen im Abstand bis 3,2 Å, Wassermoleküle sind als rote Kugeln dargestellt (die Bilder wurden mit Discovery Studio Visualizer 2.5, Accelrys, erstellt). Abb. (a): 4-Amba bindet am Boden der S1-Tasche an Ala252, Asp306 und Asp258 sowie an ein Netzwerk aus Wassermolekülen. Dieses bildet zusammen mit den restlichen, dargestellten Aminosäuren einen pentagonal-bipyramidalen Komplex (dunkle Linien, 2,18–2,47 Å) mit Ca^{2+} (lila Kugel). Abb. (b): Die Seitenkette des P2-Lysins bindet an Asn192 und Asp154 sowie an ein Netzwerk aus Wassermolekülen. Es existiert zusätzlich ein schwacher Kontakt zu Asp191 und einem weiteren Wassermolekül (dunkle Linien, 3,45–3,89 Å). Abb. (c): Die NH- und Carbonylgruppe des P3-Valins bildet ein antiparalleles β -Faltblatt zu Gly255 aus. Dieses setzt sich zwischen dem Amid-NH des 4-Amba-Restes und Ser253 fort. Oberhalb der S3-Tasche befindet sich Leu227, welches den Raum über Trp254 besetzt. Abb. (d): Die Guanidino-Gruppe des P4-Arginins bildet mit Glu236, Tyr308 und Asp264 ein starkes H-Brücken-Netzwerk aus. Zusätzlich bindet sie intramolekular an die Carbonylgruppe des P5-Decanoyl-Restes. Diese Carbonylgruppe bindet weiterhin über ein verbrückendes Wasser an das Amid-NH von Glu257.

bindet über ein verbrückendes Wassermolekül an das Amid-NH von Glu257. Zusätzlich existiert eine intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung zur Guanidinogruppe des P4-Arginins, was vermutlich zur Stabilisierung der Konformation des Inhibitors führt.

Insgesamt können zahlreiche Wechselwirkungen zwischen dem Inhibitor **74** und Furin in dem modellierten Komplex erkannt werden, die letztendlich in der Summe zu den sehr wirksamen K_i -Werten der Inhibitoren dieses Strukturtyps führen. Der Decanoyl-Rest in P5-Position steht nicht direkt mit dem Enzym in Kontakt, sondern ist in Richtung des Lösungsmittels ausgerichtet. Dadurch erklären sich auch die relativ geringen Unterschiede in den K_i -Werten der verschiedenen P5-Derivate, solange dort nur moderate Änderungen vorgenommen werden. Sobald jedoch sehr sperrige Reste, wie z. B. die Fmoc-Gruppe, eingebaut werden, sinkt auch die Affinität zum Enzym aufgrund des erhöhten Raumbedarfs.

2.7 Stabilitätsuntersuchungen

2.7.1 Stabilität des Inhibitors 17 in Wasser

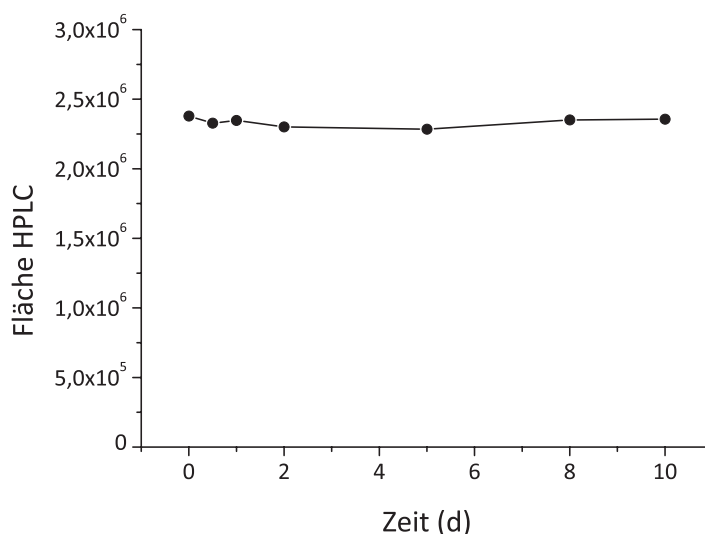
Erste Hinweise zur Stabilität der Inhibitoren wurden qualitativ bereits durch Beobachtungen während der Synthesen erhalten. So zeigte sich, dass während einer längeren Lagerung der Rohpeptide, z. B. nach milder Abspaltung mit 1 % TFA und Evaporation des Lösungsmittels, die Inhibitoren bei 4 °C sehr stabil sind. Auch während der finalen Schutzgruppenabspaltung mit 95 % TFA wurde keine signifikante Bildung von Nebenprodukten mittels HPLC festgestellt. Die lyophilisierten Endprodukte konnten bei 4 °C ohne Bildung von Nebenprodukten stabil gelagert werden. Um die Stabilität in Lösung zu untersuchen, wurde Inhibitor **17** (Phac-RVR-4-Amba, 1 mg/mL) in reinem Wasser gelöst und bei RT über mehrere Tage wiederholt mittels HPLC untersucht (Abb. [2.18 auf der nächsten Seite](#)).

Die Auftragung der Peakfläche als Funktion der Zeit zeigt, dass der Inhibitor im Zeitraum von 10 Tagen bei RT stabil ist. Deshalb können Stammlösungen dieses Inhibitor-typs ohne Bedenken über mehrere Wochen bei 4 °C oder im gefrorenen Zustand aufbewahrt werden. Dies stimmt mit früheren Ergebnissen zur Stabilität des substratanalogen Urokinase-Inhibitors Benzylsulfonyl-D-Ser-Ser-4-Amba überein, der sich bei mehrmonatiger Lagerung in Wasser als absolut stabil erwies.¹²

¹²Persönliche Informationen T. Steinmetzer.

2 Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 2.18: Stabilität des Inhibitors 17 in Wasser. Für sämtliche Messungen, durchgeführt bei RT, wurde immer die gleiche Stammlösung verwendet (Injektionsvolumen 50 μL).

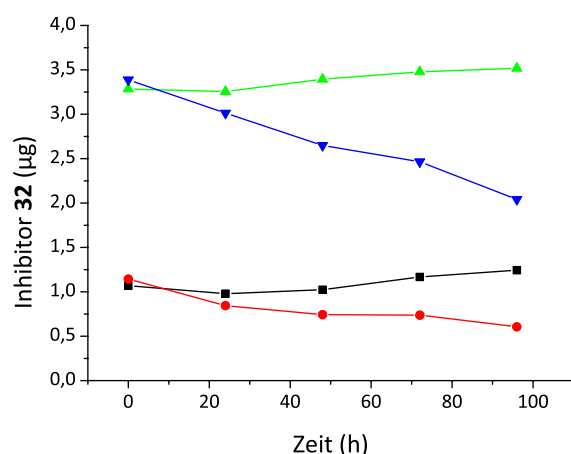


2.7.2 Stabilität der Inhibitoren in Zellkulturmedium

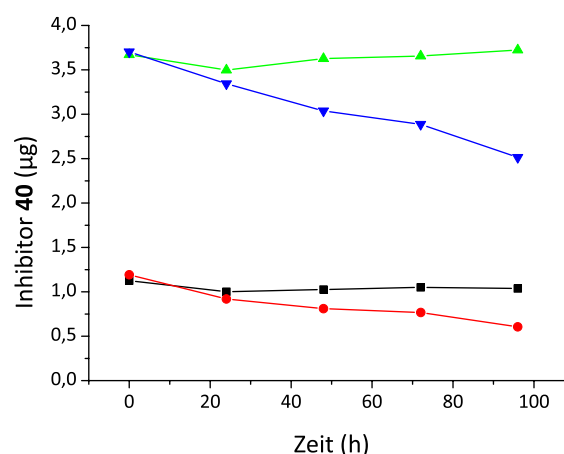
Obwohl die Verbindungen in reinem Wasser nicht zerfallen, musste auch die Stabilität im Zellkulturmedium untersucht werden, das für die virologischen Tests zum Nachweis der Hemmwirkung dieser Inhibitoren auf die Vermehrung von Geflügelpestviren verwendet wird. Diese Untersuchungen wurden zu einem späteren Zeitpunkt nur mit den beiden Inhibitoren **32** und **40** durchgeführt, da sie sich wirksamer als Inhibitor **17** erwiesen haben. Die virologischen Experimente wurden in „Madin-Darby canine kidney“-Zelllinien (MDCK) durchgeführt, die mit „Dulbecco’s modified eagle medium“ (DMEM) als Nährmedium versorgt wurden. Um die Hemmwirkung zu testen, wurden Stammlösungen der Inhibitoren in DMSO zu Beginn des Wachstums mit dem Medium verdünnt und dann über längere Zeiträume mit den Zellen inkubiert. Dabei ist wichtig, dass die Wirkstoffe unter diesen Bedingungen ausreichend stabil sind, um sie sinnvoll *in vivo* einsetzen zu können. Wie in Abschnitt [2.2.4 auf Seite 40](#) bereits gezeigt, wird z. B. der irreversibel bindende Inhibitor Dec-RVKR-CMK in Messpuffer über den Zeitraum von 24 h bereits zu großen Mengen abgebaut ($t_{1/2} = 11,4$ h). Diese Instabilität der CMK-Inhibitoren ist ein entscheidender Nachteil bei Messungen, die über längere Zeiträume durchgeführt werden.

Aus diesen Gründen wurden die beiden Inhibitoren **32** und **40** in DMEM zu Konzentrationen von 10 bzw. 30 μM verdünnt und über einen Zeitraum von 96 h bei 37 °C inkubiert. In einer weiteren Testreihe wurde die Lösung der Inhibitoren in DMEM zu MDCK-Zellkulturen gegeben, die in dieser Form auch für die späteren Versuche verwendet wurden.¹³ Die Ergebnisse sind in [Abbildung 2.19](#) gezeigt.

¹³Die Inkubation wurde in der AG Garten durchgeführt.



(a) Stabilität des Inhibitors **32** (5-Guanidinopentanoyl-RVR-4-Amba). ▲ 30 µM ohne MDCK, ▼ 30 µM mit MDCK, ■ 10 µM ohne MDCK, ● 10 µM mit MDCK.



(b) Stabilität des Inhibitors **40** (4-(Guanidinomethyl)phenylacetyl-RVR-4-Amba). ▲ 30 µM ohne MDCK, ▼ 30 µM mit MDCK, ■ 10 µM ohne MDCK, ● 10 µM mit MDCK.

Abbildung 2.19: Stabilitätsuntersuchungen der Inhibitoren **32** und **40** (Details zur Messung siehe Abschnitt 4.3 auf Seite 85). Bei sämtlichen HPLC-Messungen wurden 100 µL injiziert. Inhibitor **32**: 30 µM=3,47 µg, 10 µM=1,16 µg. Inhibitor **40**: 30 µM=3,62 µg, 10 µM=1,21 µg.

Es ist zu erkennen, dass beide Inhibitoren in reinem Medium eine sehr gute Stabilität über 96 h zeigen, da kein nennenswerter Abbau über HPLC festgestellt werden konnte. In Anwesenheit von MDCK-Zellen erfolgt jedoch eine langsame Abnahme der detektierten Inhibitormenge in Lösung. Bei einer Ausgangskonzentration von 10 µM verringert sich dabei der Inhibitor um ca. 40–50 % und bei 30 µM um 30–40 %. Ursache könnte einerseits eine Metabolisierung der Wirkstoffe durch zelleigene Enzyme, wie z. B. Proteasen, sein. Andererseits ist auch denkbar, dass die Wirkstoffe von den Zellen aufgenommen werden. Da vor jeder Messung die Lösung abzentrifugiert und nur der Überstand analysiert wurde, sind internalisierte Wirkstoffe nicht mehr über HPLC nachweisbar. Im direkten Vergleich der beiden Inhibitoren scheint dabei Inhibitor **32** etwas stärker abgebaut oder aufgenommen zu werden.

Aus diesen Stabilitätsuntersuchungen kann man schließen, dass während einer Messung von bis zu 24 h die Konzentrationsänderungen der Inhibitoren **32** und **40** vernachlässigbar sind. Neben normaler Endozytose [149] ist auch denkbar, dass eine furinvermittelte Aufnahme der Inhibitoren in die Zellen erfolgt. Dies wurde für peptidische Furinsubstrate vor kurzem gezeigt, an die der Tumorchemostoff Doxorubicin gekoppelt wurde [150]. Es ist bekannt, dass Furin intrazellulär vom Endoplasmatischen Retikulum zur Zellmembran transportiert und auch auf der Oberfläche der Zelle präsentiert wird. Inhibitoren könnten dann an Furin binden und durch die anschließende Internalisierung des Furins mit in die

Zelle transportiert werden [41]. Um die Beeinflussung der Untersuchungen in Zellkultur durch Konzentrationsänderungen der Inhibitoren weitestgehend auszuschließen, könnte der Inhibitor täglich nachdosiert werden. Dies wäre auch vergleichbar mit einer eher klinischen Situation; in der Regel wird ein Wirkstoff mindestens einmal täglich über mehrere Tage appliziert. Die Inhibitoren sind aber insgesamt gesehen unter den gewählten Bedingungen sehr stabil.

2.8 Untersuchungen zur Zytotoxizität und Virusvermehrung¹⁴

2.8.1 Zytoxi­zitäts­untersuchungen

Aus der Literatur ist bekannt, dass langkettige, ungesättigte Fettsäuren mit cis-Doppelbindungen einen membranschädigenden Einfluss haben [151]. Da in weiteren Versuchen einige der Inhibitoren mit ungesättigten P5-Resten in Zellkulturen eingesetzt werden sollten, wurden ausgewählte Verbindungen auf eine mögliche toxische Wirkung auf MDCK-Zellen untersucht. Dazu wurde eine Stammlösung der Inhibitoren in DMSO (10 mM) hergestellt und zu finalen Konzentrationen von entweder 25 oder 50 μ M mit DMEM verdünnt. Diese Lösung wurde zu konfluenten MDCK-Zellen gegeben und nach Inkubation über 24 bzw. 48 h wurde mittels des MTT-Tests (siehe [152] und Anhang, Abschnitt C) die Überlebensrate (Viabilität) der Zellen untersucht (Abb. 2.20.)

Ein Vergleich der Ergebnisse nach 24 bzw. 48 h bei einer Inhibitorkonzentration von 25 μ M zeigt, dass die längere Inkubationszeit nur einen relativ geringen Einfluss hat. Im Mittel sinkt die Rate der überlebenden Zellen nach 24 h auf 80 %, nach weiteren 24 h fällt dieser Wert nur noch geringfügig ab. Auffällig sind bereits hier die Inhibitoren **27** (Stearoyl-RVR-4-Amba) und **29** (Olenoyl-RVR-4-Amba), die einen Rückgang der Viabilität auf ca. 50 % nach 48 h Inkubation bewirken. Ein Vergleich der Messung mit 50 μ M Inhibitor im Ansatz zeigt deutlich, dass diese zwei Verbindungen toxisch sind. Alle weiteren Wirkstoffe werden allerdings relativ gut toleriert (Überlebensrate von 75–80 %), eine geringe Zytotoxizität scheint allerdings auch bei dem Linoyl-Derivat aufzutreten (**30**). Die Überlebensrate liegt hier bei ~65 %. Erstaunlicherweise ist das Linoyl-Derivat weniger zytotoxisch als das gesättigte Stearoyl- und das einfach ungesättigte Olenoyl-Derivat. Da bekannt ist, dass cis-Doppelbindungen in ungesättigten Fettsäuren eine membranschädigende Wirkung aufweisen [151], wäre ein Rückgang der Viabilität in der gleichen Grö-

¹⁴Die in diesem Abschnitt beschriebenen Experimente zur Toxizität, HA-Spaltung, Virusvermehrung und -ausbreitung sowie zur Hämagglutination wurden von Yinghui Lu, AG Garten, Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg, Marburg, durchgeführt [111].

2.8 Untersuchungen zur Zytotoxizität und Virusvermehrung

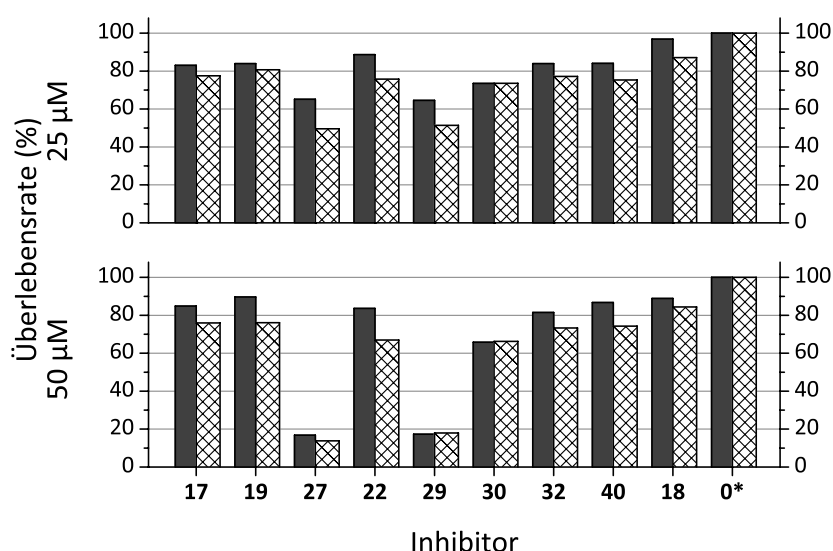


Abbildung 2.20: Viabilität von MDCK-Zellen nach Inhibitorbehandlung. Nach Inkubation von konfluenten MDCK-Zellen mit 25 oder 50 μM Inhibitor über 24 bzw. 48 h bei 37 °C wurden die Zellen über einen MTT-Test [152] auf ihre Viabilität untersucht. Zur Kontrolle wurden Zellen ohne Inhibitor identisch behandelt (0*) und das daraus resultierende Ergebnis auf 100 % skaliert. Dunkle Balken (■): 24 h, helle Balken (▨): 48 h. Die Strukturen und K_i -Werte der Verbindungen sind in Tabelle 2.1 auf Seite 24 und 2.2 auf Seite 31 zusammengefasst.

ßenordnung zu erwarten gewesen. Die Inhibitoren mit toxischer Wirkung wurden von folgenden Versuchen in Zellkulturen ausgeschlossen, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch ausbleibende Vermehrung der Viren aufgrund des Absterbens der Zellen zu verhindern.

Möglicherweise lässt sich auch ein Zusammenhang zwischen der Zytotoxizität der Inhibitoren 27 und 29 und ihrer Tendenz, Partikel auszubilden, erkennen (Abschnitt 2.2.2 auf Seite 37). Ab einer Konzentration von 2 μM konnte die Bildung größerer Partikel in Pufferlösung beobachtet werden, was eventuell auf die Ausbildung mizellärer oder lamellarer Strukturen zurückzuführen ist. Dies könnte im direkten Zusammenhang mit der toxischen Wirkung dieser Verbindungen stehen, da Interaktionen zwischen Mizellen und der Plasmamembran denkbar sind.

2.8.2 Spaltungshemmung des FPV-Hämagglutinins

Beim Beginn einer Infektion durch Influenzaviren binden diese an Oberflächenrezeptoren mit endständigen Sialinsäuren der Wirtszelle und werden über Endozytose in die Zelle aufgenommen. Durch die Wirkung spezieller Protonenpumpen in der Endosomenmembran kommt es zu einer Abnahme des pH-Wertes im Lumen. Dadurch wird der Konformationswechsel des HAs induziert, welcher die Fusion mit der Virushülle induziert

2 Ergebnisse und Diskussion

(siehe auch Einleitung, Abschnitt [1.2.3 auf Seite 6](#)). In einem späteren Stadium des Vermehrungszyklus werden die neu synthetisierten, viralen Proteine zum Golgi-Apparat und dann zur Plasmamembran transportiert. Auf diesem Weg wird das virale Hämagglutinin-Vorläuferprotein HA0 in die Untereinheiten HA1 und HA2 gespalten.

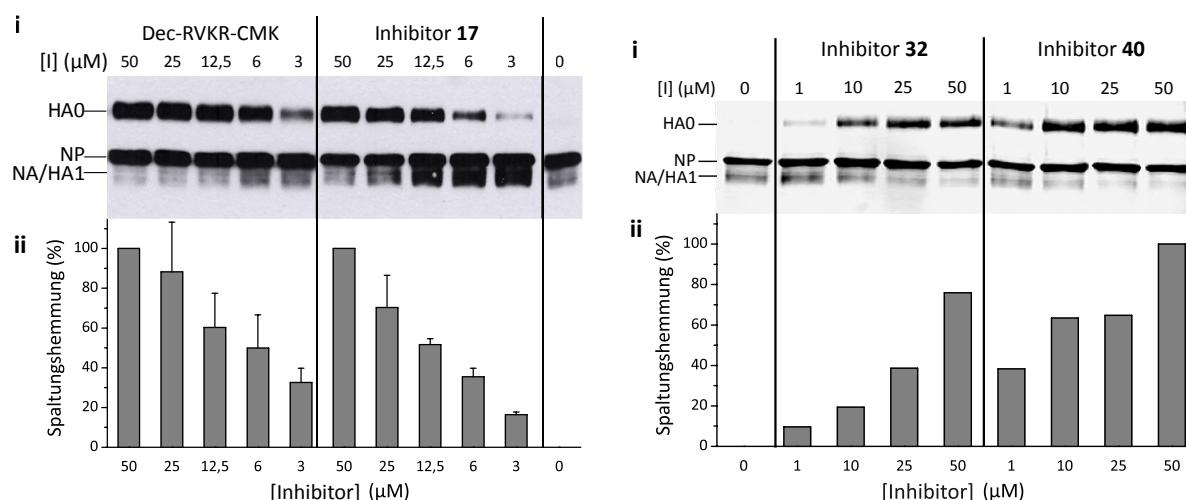
Für die Untersuchungen dieser HA-Spaltung wurde im Folgenden der gut etablierte, hochpathogene Virus-Stamm A/FPV/Rostock/34 (H7N1) eingesetzt, der zur Vermehrung auf MDCK-Zellkulturen gegeben wurde. Aufgrund der hohen Wirksamkeit in den vorhergehenden enzymkinetischen Studien wurde für die Untersuchung und Quantifizierung der proteolytischen HA-Spaltung der FPV-infizierten Zellen im ersten Ansatz Inhibitor **17** ausgewählt und mit dem Referenzinhibitor Dec-RVKR-CMK verglichen. Im weiteren Verlauf wurden die wenig toxischen Inhibitoren aus [Abbildung 2.20](#) für diesen Test eingesetzt.

Außer für die Inhibitoren **32** und **40**, die sehr niedrige K_i -Werte von 60 bzw. 14 pM im Enzymtest zeigten, konnte aber im Versuchsverlauf bei 25 μ M Inhibitorkonzentration für die anderen Inhibitoren keine hinreichende HA-Spaltungsinhibition festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Für die Untersuchung wurden bodenhaftende MDCK-Zellen in DMEM mit einer hohen MOI („Multiplicity of Infection“) infiziert, so dass eine schnelle Ausbreitung der Viren gewährleistet war. Gleichzeitig erfolgte die Zugabe der in Medium gelösten Inhibitoren in verschiedenen Konzentrationen. Die Ansätze wurden über 16–24 h inkubiert, abhängig von der Geschwindigkeit der Vermehrung. Bei einem Hämagglutinations-Titer von 2^7 HAU im Zellüberstand der Kontrolle (für Methode des HA-Tests siehe Abschnitt [2.8.3](#)) wurden die Zellen bei niedriger Drehzahl abzentrifugiert, die Viren im Überstand durch Ultrazentrifugation pelletiert und die viralen Proteine über SDS-PAGE und Western-Blot analysiert ([Abbildungen 2.21i](#)).

Die Quantifizierung der Spaltung erfolgte unter Verwendung eines Zweit-Antikörpers, der mit einem nah-IR Farbstoff markiert wurde und zum Nachweis mit dem „LI-COR-Odyssey Imaging“-System geeignet ist. Es wurde die Bande des ungespaltenen HA0 analysiert, da das entstehende HA2 aufgrund einer schlechten Affinität zum verwendeten Antikörper nicht quantifiziert werden kann. Auch die Bande der HA1-Untereinheit ist ungeeignet, weil eine Unterscheidung von der auf gleicher Höhe eluierenden Bande der Neuraminidase nicht möglich ist. Zur Standardisierung der aufgetragenen Proteinmenge wurde jeweils die entsprechende NP-Bande verwendet. Die Ergebnisse der Quantifizierung sind in den [Abbildungen 2.21ii](#) gezeigt.

Bei einer Konzentration von 50 μ M wird die Spaltung bei allen Inhibitoren nahezu vollständig gehemmt. Eine schrittweise Verdünnung der Inhibitorlösung führt zu einem

2.8 Untersuchungen zur Zytotoxizität und Virusvermehrung



(a) i: Inhibition der HA-Spaltung durch Verbindung 17 und Dec-RVKR-CMK als Kontrolle. Inkubation erfolgte für 16 h, ii: Quantifizierung der HA-Spaltungsinhibition. Gezeigt sind Ergebnisse von drei Versuchen. Es wurde die 50 μM HA0-Bande des Referenzinhibitors auf 100 % gesetzt.

(b) i: Inhibition der HA-Spaltung durch Verbindung 32 und 40. Inkubation erfolgte für 24 h, ii: Quantifizierung der HA-Spaltungsinhibition. Gezeigt ist das Ergebnis eines Versuches. Es wurde die 50 μM HA0-Bande des Inhibitors 40 auf 100 % gesetzt.

Abbildung 2.21: HA-Spaltungshemmung und -quantifizierung durch die Inhibitoren 17, 32 und 40. Die Zellen wurden bei einer MOI von 10 pro Zelle infiziert. HA0 (82 kDa), Nukleoprotein NP (56 kDa) und HA1 (~50 kDa). Die Bande der Neuraminidase (NA) überlagert sich mit HA1. HA2 (32 kDa) kann mit dem verwendeten Antiserum nicht detektiert werden und ist nicht abgebildet. Für Material und Methoden siehe [32, 111] und Anhang C auf Seite V.

sukzessiven Verlust von ungespaltenem HA0. Der IC_{50} -Wert von Verbindung 17 in diesem Test beträgt ungefähr 10 μM und ist vergleichbar mit dem des Referenzinhibitors. Der IC_{50} -Wert von Inhibitor 32 hingegen beträgt zwischen 25 und 50 μM, während er für Inhibitor 40 zwischen 1 und 10 μM liegt. Im Gegensatz zu den subnanomolaren K_i -Werten, die aus den enzymkinetischen Untersuchungen erhalten wurden, sind in diesem Versuch deutlich höhere Konzentrationen der Inhibitoren nötig, um eine 50%ige Inhibition der HA0-Spaltung zu erreichen. Inhibitor 40, der im Enzym-Test Furin am effektivsten hemmen konnte, hat auch hier die stärkste Wirkung, auch wenn der IC_{50} -Wert mit den vorhandenen Messdaten nicht genau bestimmbar ist. Dass dennoch die K_i - und IC_{50} -Werte um Größenordnungen auseinander liegen, kann mit der intrazellulären Lokalisation des Furins im trans-Golgi Netzwerk zusammenhängen [153], was die Protease für polare, multibasische Inhibitoren schlecht zugänglich macht. Diese deutlich schlechtere Hemmwirkung in zellulären Tests wurde bereits für viele andere Furininhibitoren beobachtet [76, 81, 95, 154, 155].

2.8.3 Untersuchungen zur Virusausbreitung

Aus der Messung der Spaltungshemmung ist ersichtlich geworden, dass die Inhibitoren in der Lage sind, die Spaltung des viralen Oberflächen-HAs in Zellkulturen zu inhibieren. Da diese Spaltung essenziell für die Verschmelzung von Virushülle und Endosomenmembran und somit für die Virusvermehrung ist, wurde in einem weiteren Versuch die Hemmung der Virusausbreitung untersucht [156]. Dazu wurden bodenhaftende MDCK-Zellen mit Medium überschichtet und mit einer sehr niedrigen MOI von 0,002 mit FPV infiziert, um eine langanhaltende, multizyklische Replikation des Virus zu ermöglichen. Dies entspricht eher der natürlichen Situation, wenn ein Wirt zu Beginn einer Infektion nur wenigen Viren ausgesetzt wird. Nach Zugabe der Inhibitoren in verschiedenen Konzentrationen wurden die Kulturen für 18 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen vom Medium befreit, fixiert und durch konjugierte Immunfärbung mit einem FPV-Antikörper nur die infizierten Zellen blau angefärbt (Abbildung 2.22a).

Die infizierten Zellen stellen sich als „raketenförmige“ blaue Punkte oder Flächen auf den Zellrasen dar. Dies zeigt eine Ausbreitung der Viren auf Nachbarzellen. Wird die Ausbreitung nicht inhibiert, so färben sich praktisch alle Zellen, was eine globale Infektion anzeigt. Bei Zugabe der Inhibitoren **38** und **40**, welche die stärksten Furin-Hemmstoffe sind, konnte die Virusausbreitung bei Konzentrationen $\geq 10 \mu\text{M}$ fast vollständig verhindert werden (Abb. 2.22a). Inhibitor **32**, mit dem 5-(Guanidino)pentanoyl-Rest in P5-Position, zeigt eine schwächere Hemmung der Virusausbreitung. In zusätzlichen Versuchen konnte durch die Verwendung anderer Inhibitoren (aus Abb. 2.20) keine nennenswerte Hemmung der Ausbreitung festgestellt werden (nicht gezeigt).

Zusätzlich zur Visualisierung der infizierten Zellen durch den Ausbreitungstest wurde die Anzahl der Viruspartikel im Überstand durch den Hämagglutinations-Test (HA-Test) bestimmt [116]. Die Hämagglutinine, die auf der Oberfläche der Virushülle präsentiert werden, sind in der Lage, Erythrozyten zu vernetzen und so einen sichtbaren Zellrasen zu bilden. Sind keine Viren oder Hüllfragmente mehr vorhanden, sammeln sich sämtliche Erythrozyten in der Mitte der konischen Testplatte; es bildet sich kein Zellrasen mehr aus. Weil die HA-Proteine auch auf Hüllfragmenten vermehrungsunfähiger Viren zu finden sind, kann man durch diesen Test nur eine Aussage über die Anzahl aller nicht-infektiöser und infektiöser Viruspartikel zusammen in der Probe treffen. Dazu wird eine Verdünnungsreihe der Viruslösung (Überstand der Zellkultur) in Puffer hergestellt und zu der Erythrozytensuspension gegeben. Der Virustiter ergibt sich aus der Verdünnung, bei dem die Anzahl der Partikel zu gering ist, um noch eine Vernetzung der Erythrozyten zu bewirken (Abbildung 2.22b).

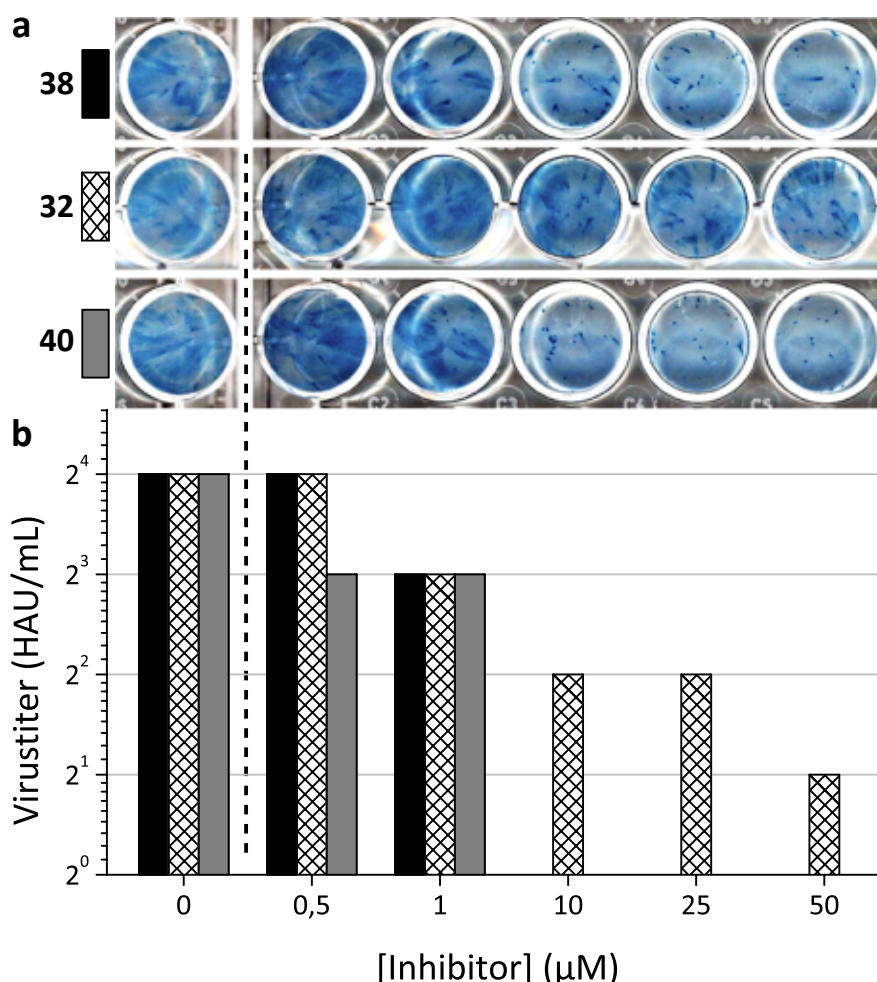


Abbildung 2.22: Hemmung der Virusausbreitung in Anwesenheit der Furininhibitoren **32**, **38** und **40** (Methoden, s. Anhang C auf Seite V und [157]). (a) MDCK-Kulturen wurden bei einer MOI von 0,002 mit 0,2 mL einer 10⁻⁶-fachen Verdünnung von FPV (Verdünnung der allantoischen Flüssigkeit aus Hühnereiern in PBS) infiziert und mit in Medium gelöstem Inhibitor versetzt. Nach 18 h Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen mit PFA fixiert und infizierte Zellen gefärbt (Antikörper: FPV-Antiserum (Kaninchen), sekundärer Antikörper: Kaninchen-Antiserum (Esel–Meerrettich-Peroxidase–Konjugat), Färbung durch Trueblue (KPL, Gaithersburg, MD, USA)). (b) Für die HA-Titration der Viren im Überstand (Dreifachbestimmung) wurden nach 18 h Inkubation Proben der Überstände vor der Fixierung entnommen. Es folgte eine serielle Log2 Verdünnung der Viren in PBS und HA-Test mit 0,5 % Hühnererythrocyten, suspendiert in PBS [116, 158]. Im Überstand der mit Inhibitor **38** und **40** behandelten Proben waren bei Konzentrationen $\geq 10 \mu\text{M}$ keine Viren mehr feststellbar.

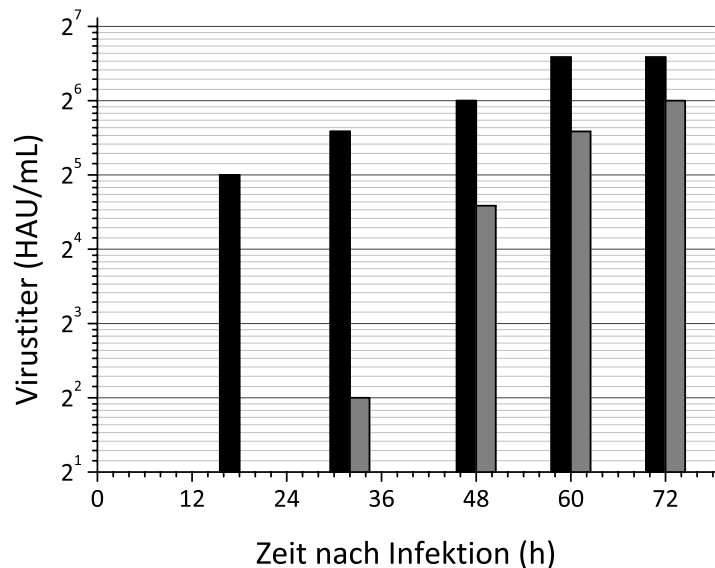
Das Ergebnis der Hämagglutininierungs-Messungen bestätigt die Resultate des Ausbreitungstests. Im Überstand der Inhibitoren **38** und **40** sind ab einer Inhibitorkonzentration von 10 μM keine Viren mehr nachweisbar, während die Wirkung der Verbindung **32** geringer ist und die Anzahl der Viruspartikel mit steigender Konzentration langsam abnimmt.

2 Ergebnisse und Diskussion

2.8.4 Untersuchung zur Hemmung der multizyklischen Replikation

Im vorangegangenen Abschnitt wurde durch den HA-Test nach einer bestimmten Zeit die Virus-Partikelmenge im Überstand einer Zellkultur bestimmt. Da es sich dabei nur um die Auswertung eines einzelnen Messpunktes handelt, kann keine Aussage über die Kinetik der Hemmung der Virusvermehrung getroffen werden. Dies kann durch ein Experiment, bei dem die Viren mehrere Vermehrungszyklen durchlaufen, untersucht werden. Der Versuchsaufbau entspricht dem aus dem vorigen Abschnitt. Auch hier erfolgte die Infektion bodenhaftender Zellkulturen mit einer sehr niedrigen MOI, um eine langsame Virusvermehrung zu Beginn der Inkubation sicherzustellen. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten wurde dann aus dem Überstand der Zellkulturen eine Probe entnommen und ein HA-Test durchgeführt, um den Virustiter zu bestimmen. Die Wirksamkeit für Inhibitor 17 im Vergleich zur Kontrolle ohne Inhibitor ist in Abbildung 2.23 gezeigt.

Abbildung 2.23: Hemmung der multizyklischen Replikation durch Inhibitor 17. Auftragung der Virustiter als Funktion der Inkubationszeit (10, 18, 32, 48, 60 und 72 h) ohne (■) und mit Inhibitor 17 (▒). Die Infektion erfolgte bei einer MOI von 10^{-5} PFU. Die Inhibitorkonzentration im Ansatz betrug $25 \mu\text{M}$, es wurden je $50 \mu\text{L}$ Proben entnommen. Gezeigt sind Mittelwerte 4 unabhängiger Versuche [111]. Nach 10 h konnten noch keine Viruspartikel nachgewiesen werden.



Der Versuch zeigt eine deutliche Verlangsamung der Virusvermehrung in Anwesenheit des Inhibitors 17, die im Vergleich zu den unbehandelten Zellen um ~ 24 h verzögert ist. Ohne Inhibitor bilden sich bereits nach 18 h signifikante Mengen an Viruspartikeln. Dass sich nach einer gewissen Zeit die Zahl der Viruspartikel trotz Zugabe von Inhibitor 17 einem ähnlichen Wert wie bei der Kontrolle nähert, spricht dafür, dass der Wirkstoff kaum zytotoxisch ist.

Dieser Versuch wurde auch für einige weitere Inhibitoren mit anderen P5-Resten durchgeführt. Dabei wurde bewusst auch Inhibitor 17 erneut getestet, um einen direkten Vergleich zwischen den Inhibitoren zu ermöglichen; das erhaltene Ergebnis ist in Abbildung 2.24 gezeigt. Im Gegensatz zu der vorigen Abbildung wurde hier auf der Ordinate

2.8 Untersuchungen zur Zytotoxizität und Virusvermehrung

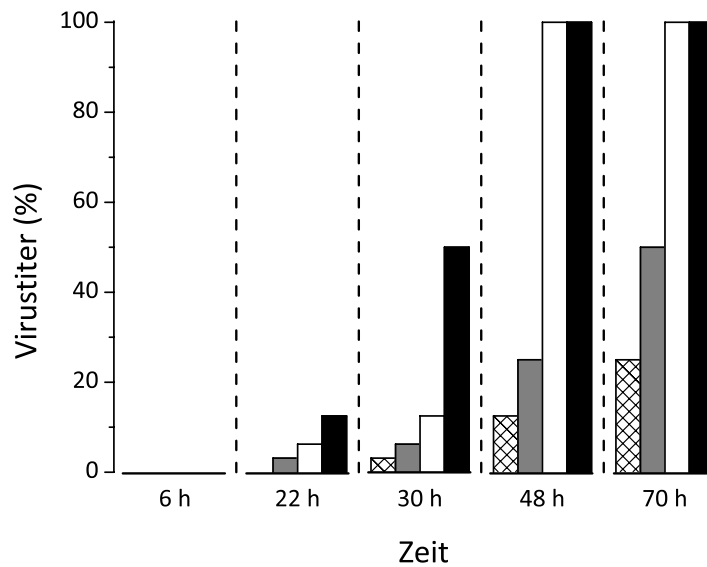


Abbildung 2.24: Hemmung der multizyklischen Replikation durch Inhibitoren mit unterschiedlichen P5-Resten im Vergleich zur Kontrolle ohne Inhibitor (■). Die finale Konzentration der Inhibitoren betrug $50 \mu\text{M}$. Die Infektion erfolgte bei einer MOI von 0,002, es wurde eine Dreifachbestimmung jeder Probe zu den angegebenen Zeitpunkten durchgeführt. Die Auftragung auf der Ordinate ist prozentual auf den maximalen Virustiter der Kontrolle normiert. Der Wert für die Kontrolle bei 70 h ist extrapoliert, da die Zellkulturen bei sehr dichtem Wachstum absterben. □ Inhibitor 32, ■ Inhibitor 17, ▨ Inhibitor 40. Siehe auch Anhang, Abschnitt C auf Seite V. Nach 6 h Inkubationszeit konnten in keiner der vier Proben Viruspartikel im Überstand nachgewiesen werden, im Falle von Inhibitor 40 konnten auch nach 22 h noch keine Partikel bestimmt werden.

der Virustiter nicht in der Einheit HAU/mL angegeben, sondern als prozentuale Normierung auf 100 % des maximalen Virustiters der Kontrolle nach 48 h. Durch diese Art der Auftragung kann man die Unterschiede in den Wachstumsgeschwindigkeiten deutlicher erkennen. Wie beim vorigen Versuch verzögert auch hier Inhibitor 17 das Wachstum um ~24 h (Vergleich graue (■) und schwarze (■) Balken). Der direkte Vergleich mit Inhibitor 40 (▨) zeigt, dass durch diesen Wirkstoff die Virusvermehrung nochmals um einige Stunden verlangsamt wird. Erst ab 30 h konnten für diesen Inhibitor überhaupt Viruspartikel im Überstand nachgewiesen werden. Nach 70 h beträgt der Virustiter in mit Inhibitor 17 versetzten Kulturen 50 % der Kontrolle ohne Inhibitor, während er bei Inhibitor 40 nur 25 % erreicht. Zu diesem Zeitpunkt ist die Virusvermehrung also im Vergleich zum Wert von Inhibitor 17 nach 48 h zusätzlich um ~22 h verzögert.

In einem Organismus, der mit diesen Viren infiziert worden ist, kann diese beträchtliche Verzögerung des Wachstums dem angeborenen Immunsystem wahrscheinlich genügend Zeit geben, um auf die Infektion zu reagieren und den Krankheitsverlauf einzudämmen.

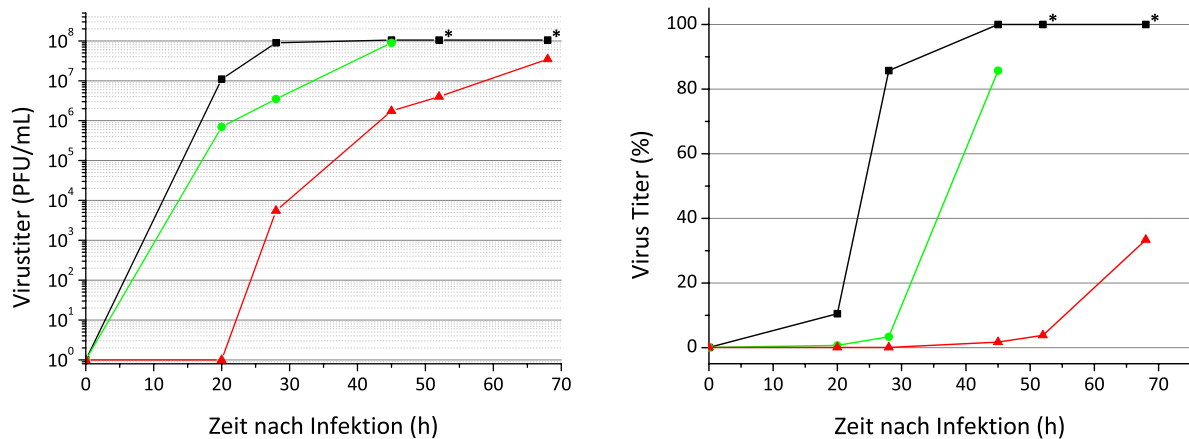
2 Ergebnisse und Diskussion

Durch eine geringe Viruslast im Körper sind außerdem schwächere Krankheitssymptome zu erwarten.

2.8.5 Quantitative Bestimmung infektiöser Viruspartikel

Der in Abbildung 2.24 auf der vorigen Seite durchgeführte HA-Test weist allerdings wie schon erwähnt zusätzlich zu vermehrungsfähigen Viren auch nicht infektiöse Virusfragmente nach. Durch das Nachschalten eines Plaque-Tests ist es jedoch möglich, ausschließlich die Anzahl infektiöser Partikel im Zellüberstand zu bestimmen. Zunächst werden identisch zum vorigen Test bodenhaftende Zellkulturen mit einer niedrigen MOI für 1 h infiziert, gewaschen und dann mit Inhibitor in Medium über mehrere Tage inkubiert. Es werden zu bestimmten Messpunkten Proben aus den Überständen entnommen, aus denen eine serielle Verdünnungsreihe 1:10 hergestellt wird. Jede Probe der Reihe wird nun erneut verwendet, um frische, bodenhaftende Zellkulturen für 1 h zu infizieren. Nach Waschen der Kulturen erfolgt eine Überschichtung der Zellen mit einem mikrokristallinen Zellulose-Film und dem Medium. Nach 40 h Inkubation wird dann die Zelluloseschicht entfernt, die Zellen mit PFA fixiert und durch Immunfärbung nur die infizierte Zellen sichtbar gemacht [156]. Durch die Überschichtung während der zweiten Inkubation werden die aus den Zellen austretenden Viren daran gehindert, sich über den Zellrasen auszubreiten. So ist es möglich, später einzelne „plaque-forming-units“ (PFU) zu zählen, mit den entsprechenden Verdünnungsfaktoren zu multiplizieren und so die Anzahl der infektiösen Viruspartikel zu jedem Zeitpunkt der Entnahme für jeden Inhibitor zu bestimmen. Zusätzlich wurde immer eine Kontrolle ohne Inhibitor parallel mitgeführt. Eine logarithmische Auftragung der Ergebnisse für die Inhibitoren **32** und **40** sowie der Kontrolle ist in Abbildung 2.25a zu sehen. Um die Unterschiede im Wachstum noch zu verdeutlichen, wurde eine auf die maximale Anzahl der PFU normierte Auftragung basierend auf dem Wert der Kontrolle bei 45 h angefertigt (Abb. 2.25b).

Die quantitative und hoch selektive Bestimmung von ausschließlich infektiösen Viruspartikeln zeigt, dass die Produktion von FPV in Zellkulturen, die mit Inhibitor **32** behandelt wurden, im Vergleich zur Kontrolle signifikant verlangsamt wird. Bedeutend stärker wirkt Inhibitor **40**, der eine Freisetzung von neu synthetisierten Viren in den Überstand über einen Zeitraum von 20 h komplett verhindert. Wenn nach 45 h die Kontrolle den maximalen Virustiter erreicht, kann in der Probe von Inhibitor **40** nur 1,7% der maximalen PFU nachgewiesen werden. Das langsame Ansteigen des Virustiters gegen Ende der Messung nach 68 h auf einen relativ niedrigen Titer von $3 \cdot 10^7$ PFU/mL weist darauf hin, dass die Zellen in Gegenwart von Inhibitor **40** nicht geschädigt werden. Die Zunah-



(a) Logarithmische Auftragung der infektiösen Viruspartikel (PFU) als Funktion der Zeit. Als Startpunkt wird 1 PFU gesetzt.

(b) Auf 100 % normierte lineare Auftragung der PFU (basierend auf der Kontrolle bei 45 h) als Funktion der Zeit.

Abbildung 2.25: Quantitative Bestimmung infektiöser Viruspartikel (PFU). Infektion erfolgte bei einer MOI von 0,0002 gefolgt von Zugabe von je 50 μ M Inhibitor. Es wurden je 50 μ L Proben zu den Zeitpunkten 0, 20, 28, 45, 52 und 68 h entnommen und für den Plaque-Test verwendet. ■ Kontrolle ohne Inhibitor, ● Inhibitor 32, ▲ Inhibitor 40. * Der Wert für die Kontrolle bei 52 und 68 h ist extrapoliert, da die Zellkulturen bei sehr dichtem Wachstum absterben. Gezeigt sind Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen (Methode, siehe Anhang C).

me des Titers kann mehrere Gründe haben: (i) Das im Endoplasmatischen Retikulum oder im Trans-Golgi-Netzwerk lokalisierte Furin wird nicht von ausreichenden Mengen Inhibitor erreicht; (ii) Der Inhibitor wird intrazellulär durch Proteasen abgebaut; (iii) Die Spaltung des FPV-HA0 erfolgt durch die kürzlich beschriebene trypsinartige Serinprotease TMPRSS13 [159, 160]; (iv) Die Spaltung des HA0 erfolgt durch eine andere furinartige Propeptidkonvertase, die von den hier vorgestellten Inhibitoren schwächer gehemmt wird. Als Ergebnis dieses Versuches bestätigt sich jedoch, dass Inhibitor 40 eine starke antivirale Wirkung besitzt und diese nicht auf einen zytotoxischen Effekt zurückzuführen ist.

2.9 Biotinylierte Inhibitoren

Trotz mehrerer Versuche ist es in der AG Than¹⁵ bisher noch nicht gelungen, mit den in dieser Arbeit beschriebenen Inhibitoren Kristalle im Komplex mit Furin zu erhalten. Das verwendete rekombinante Furin wurde in einer CHO-Zelllinie exprimiert („Chinese

¹⁵Die Versuche zur Verwendung der biotinylierten Inhibitoren für die Herstellung von Affinitätsäulen wurden von der AG Than, Leibniz Institut für Altersforschung, Fritz Lipmann Institut, Jena, durchgeführt (unpublizierte Daten).

2 Ergebnisse und Diskussion

hamster ovary (cells)“) [81]. Da es sich bei Furin um ein Typ-I-Membranprotein handelt, wird ein Plasmid-Konstrukt verwendet, dem der C-terminale Membrananker fehlt, um das Enzym in löslicher Form zu erhalten. Anschließend wird das Enzym über mehrere klassische Chromatographieschritte gereinigt, enthält jedoch in der Regel noch Verunreinigungen, die sich möglicherweise als störend bei Kristallisationsexperimenten erweisen. In vielen Fällen wird für eine effektive, finale Reinigung von Enzymen eine Affinitätssäule verwendet, wenn geeignete Chromatographiemedien zur Verfügung stehen. Um die Reinigung von Furin zu optimieren wurde basierend auf den zuvor beschriebenen Inhibitoren mit C-terminalem 4-Amba-Rest versucht, einen geeigneten Hemmstoff für die Herstellung von Affinitätsmaterialien zu entwickeln. Dieser Inhibitor sollte eine moderate Furinhemmung besitzen, damit das auf der Affinitätssäule gebundene Enzym relativ einfach durch Zugabe von Salz oder eines stärkeren Inhibitors wieder eluiert werden kann. Eine gut etablierte Methode zur Herstellung von Affinitätsmedien ist die kovalente Kopplung eines Biotin-Restes an Enzymliganden, der dadurch an kommerziell erhältliche Streptavidin-Sepharose gebunden werden kann.

Als Startpunkt für die Entwicklung eines biotinylierten Liganden diente Inhibitor **82** (Ac-VR-4-Amba), der Furin mit einem K_i -Wert von $2,39 \mu\text{M}$ hemmt. Dieser Wert liegt in der Mitte des empfohlenen Bereichs für die Bindungskonstanten (10^{-4} – 10^{-8} M) von Liganden für die Affinitätschromatographie.¹⁶ Deshalb wurde die Acetyl-Gruppe in P4-Position zunächst durch einen Linker (8-(Amino)-3,6-dioxa-octansäure, Ado) ausgetauscht, an dessen N-terminaler Aminogruppe ein Biotin-Rest angekoppelt wurde (Verbindung **79**). Die Strukturen der Verbindungen **79**, **82** und weiterer biotinylierter Inhibitoren sind in Tabelle 2.6 zusammengefasst.

Erste Versuche in der AG Than zur Reinigung des Maus-Furins haben gezeigt, dass Inhibitor **79** zwar sehr gut über das Biotin an die Streptavidin-Säule bindet, aber das gesamte aufgetragene Furin direkt im Durchfluss der Säule zu finden ist. Furin kann also nicht an die so modifizierte Affinitätssäule binden¹⁷, obwohl der K_i -Wert von $4,6 \mu\text{M}$ hätte ausreichend sein sollen. Möglicherweise verhindern auch sterische Probleme die Bindung von Furin an das Säulenmaterial.

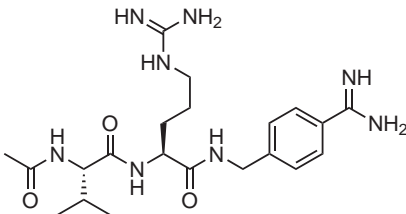
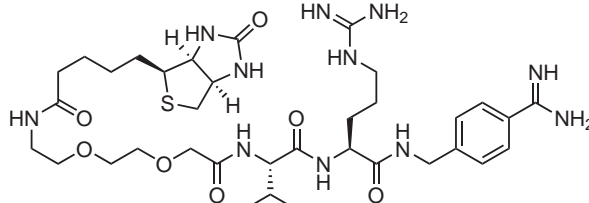
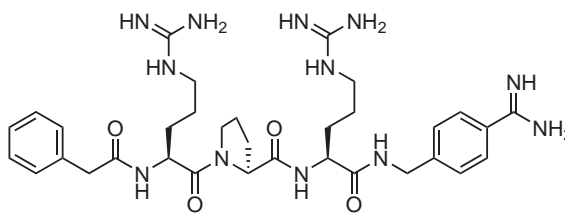
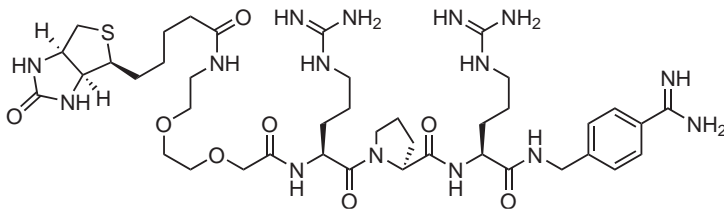
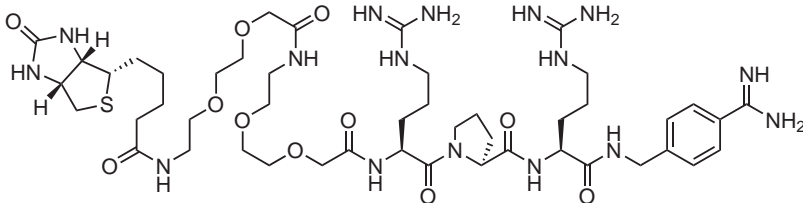
Um gleichzeitig die Bindungsstärke zu erhöhen und den Abstand zwischen dem P1-Rest und der Biotingruppe um 3 Atome zu verlängern, wurde ausgehend von Inhibitor **52** das biotinylierte Derivat **80** hergestellt, welches Furin mit einem K_i -wert von $38,3 \text{ nM}$

¹⁶Laut Herstellerangaben der Streptavidinsäulen, GE Healthcare, München, Deutschland.

¹⁷Persönliche Informationen, Manuel Than, Leibnitz Institut für Altersforschung, Fritz Lipmann Institut, Jena.

hemmt. Jedoch zeigte sich im Experiment ein ähnliches Ergebnis wie zuvor. Der synthetisierte Biotin-Inhibitor eignet sich zum Beladen des Streptavidins, aber Furin bindet nur bei extrem niedrigen Salzkonzentrationen an die modifizierte Säule und wird bereits bei einer NaCl-Konzentration von 20 mM komplett eluiert. Dies spricht eindeutig für eine unspezifische Bindung des Furins an die Affinitätssäule.

Tabelle 2.6: Ausgangsstrukturen und daraus abgeleitete biotinylierte Inhibitoren.

Nr.	Struktur	K _i (nM)
82		2390
79		4200 ^a
52		36,7
80		38,3
81		57,4

^a Für die Auswertung wurden nur Inhibitorkonzentrationen bis 60 μ M verwendet. Bei höheren Konzentrationen wurde im Dixon-Plot eine Abweichung von der Linearität beobachtet, wie bereits in Abbildung 2.6 auf Seite 35 für Inhibitor 27 gezeigt.

2 Ergebnisse und Diskussion

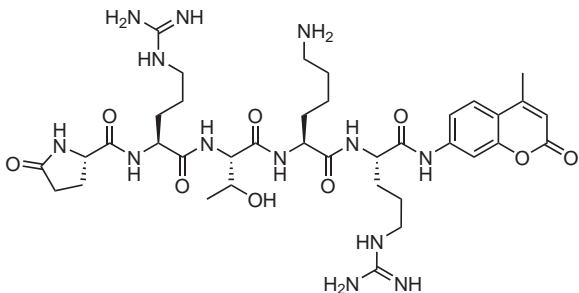
Da die Bindungsstärke von Inhibitor **80** auf alle Fälle hätte ausreichend sein sollen, war zu vermuten, dass das Problem auf einer unzureichenden Länge des Linkers beruht. Der Abstand zwischen Biotin und dem P4-Arg wurde deshalb durch Einführung eines zweiten Ado-Restes um weitere 9 Atome verlängert. Mit Inhibitor **81** war es dann möglich, eine geeignete Affinitätssäule zu entwickeln. In Vorversuchen zeigte sich, dass das gebundene Furin erst bei einer NaCl-Konzentration von 500 mM eluiert wird, d. h., dass das Furin deutlich spezifischer bindet und dadurch gereinigt werden kann.¹⁷ Es ist zu vermuten, dass man Furin alternativ auch direkt mit einem stärker bindenden Inhibitor eluieren kann, so dass der Komplex direkt für die Kristallisationsexperimente verwendbar ist.

2.10 AMC-Substrate für Furin

Für die Messungen aller K_i -Werte wurde das kommerziell erhältliche Substrat Pyr-RTKR-AMC (Bachem, Schweiz, Referenzsubstrat) verwendet. Basierend auf den in der Arbeit synthetisierten Inhibitoren wurde auch versucht, zwei alternative, fluorogene Furinsubstrate mit einem Arg-AMC als P1–P1'-Segment zu synthetisieren (Strukturen in Tabelle 2.7). N-terminal wurde dafür eine Acetyl- oder eine Phenylacetylgruppe verwendet.

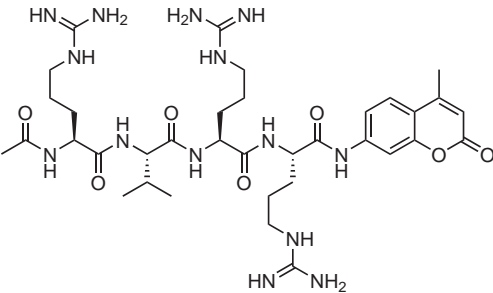
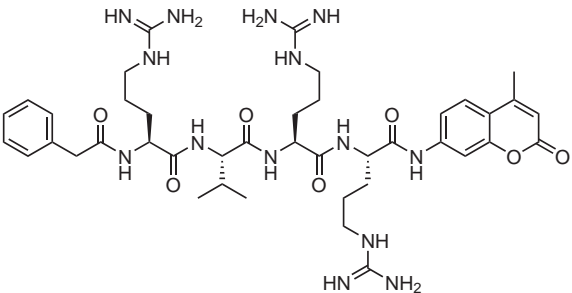
Die Synthese verlief analog der Strategie der Inhibitoren mit dem Unterschied, dass anstelle des 4-Amba-Restes das H-Arg-AMC-Segment gekoppelt wurde. Die kinetischen Konstanten K_m - und V_{max} für diese Substrate wurden im Standard-Test neben dem Referenzsubstrat bestimmt. Die Auftragung der Michaelis-Menten-Kurven ist in Abb. 2.26 dargestellt. Die Berechnung des Quotienten aus k_{cat}/K_m (Abb. 2.7) zeigt, dass Verbindung **86** ein etwas effektiveres Substrat als das kommerziell Erhältliche ist.

Tabelle 2.7: AMC-Substrate für Furin

Nr.	Struktur	K_m (μM)	V_{max} (RFU/s)	k_{cat}/K_m^b (L/(mol·s))
Ref. ^a		4,52	13,67	$0,76 \cdot 10^5$

Fortsetzung auf der nächsten Seite...

Tabelle 2.7: AMC-Substrate für Furin, Fortsetzung

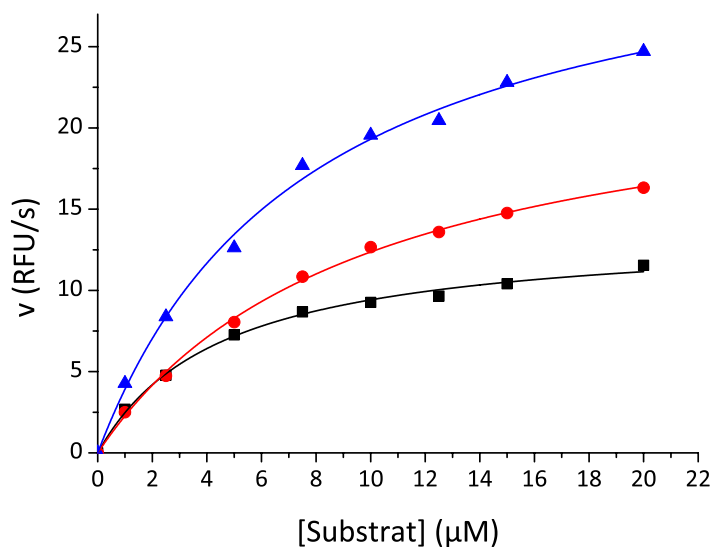
Nr.	Struktur	K_m (μM)	V_{\max} (RFU/s)	k_{cat}/K_m^b ($\text{L}/(\text{mol}\cdot\text{s})$)
85		9,68	24,33	$0,59 \cdot 10^5$
86		7,72	34,21	$1,04 \cdot 10^5$

^a Referenzsubstrat Pyr-RTKR-AMC (Bachem, Schweiz)^b als Enzymkonzentration wurde 0,95 nM zugrundegelegt

Von Krysan wurden bereits 1999 verschiedene Hexapeptid-AMC-Substrate für Furin untersucht [161]. Dort wurde für ein vergleichbares Substrat (Ac-AARYKR-AMC) ein ähnlicher Wert für k_{cat}/K_m von $2,3 \cdot 10^5 \pm 22\%$ gefunden. Es zeigte sich, dass die Einführung eines P6-Arginins (Ac-RARYKR-AMC) die Effizienz des Substrates um den Faktor 10 auf

Abbildung 2.26: v/S -Charakteristik verschiedener Furinsubstrate.

■ Pyr-RTKR-AMC (Ref.), ● Ac-RVRR-AMC (85), ▲ Phac-RVRR-AMC (86). Die Konzentrationen der Substrate wurden hier nicht um den Peptidgehalt korrigiert.



2 Ergebnisse und Diskussion

$2,6 \cdot 10^6 \pm 38\%$ erhöhen konnte. Die Untersuchung des Substrates mit Lysin in P4-Position (Ac-RAKYKR-AMC) bewirkte eine deutliche Verschlechterung auf $8,3 \cdot 10^4 \pm 19\%$. Dieses Ergebnis stimmt mit den gemessenen K_i -Werten der Inhibitoren überein, bei denen der Austausch des P4-Arginins zu Lysin ebenfalls eine erhebliche Reduktion in der Hemmwirkung verursachte. Letztendlich ist auch ähnlich zu den K_i -Werten der Inhibitoren das P5-Phenylacetyl-Derivat (**86**) ein etwas effektiveres Substrat als die acetylierte Variante (**85**).

3 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden neuartige, peptidomimetische Inhibitoren, welche die Proproteinkonvertase Furin effektiv hemmen, synthetisiert und charakterisiert. Ausgehend von der Struktur des irreversiblen Referenzinhibitors Dec-RVKR-CMK und der Konsensussequenz für Furinsubstrate wurde zunächst Ac/Phac-RVR-P1 als Startpunkt der Synthese gewählt. Der Chlormethylketon-Inhibitor wurde zwar in der Vergangenheit intensiv für biochemische Untersuchungen an Furin eingesetzt, diese Struktur eignet sich jedoch nicht für die Wirkstoffentwicklung. Aufgrund der reaktiven Carbonylgruppe sind CMK-Inhibitoren in physiologischer Lösung oder in Puffer instabil, was durch die Literatur bekannt war [105] und durch Messungen mit dem Referenzinhibitor in dieser Arbeit bestätigt werden konnte (siehe Abschnitt 2.2.4 auf Seite 40).

3.1 Synthese und Optimierung der Furininhibitoren

3.1.1 P1-Gruppe

Anstelle des Arg-CMK-Segmentes aus wurden aus den oben genannten Gründen decarboxylierte Arginin- und Lysinmimetika sowie einige weitere basische Gruppen in der P1-Position verwendet, die aus der Entwicklung von Thrombininhibitoren bereits bekannt waren [101–103]. Die Messung der K_i -Werte dieser Verbindungen ergab, dass bereits die decarboxylierten Arginin- (**11**, 78 nM) und *nor*-Argininderivate (**6**, 63 nM) mit einer Phenylacetylgruppe in P5-Position im Vergleich zu vielen in der Literatur beschriebenen Inhibitoren eine recht wirksame Furinhemmung zeigen. Weiterhin wurden zyklische Strukturen, abgeleitet von Diaminoxylenen, sowie zwei Aminomethylpiperidin-Derivate und 4-Aminomethylbenzamidin als basische P1-Gruppen verwendet. Von den synthetisierten Inhibitoren der ersten Serien stellte sich das 4-Amba-Derivat (**17**, Phac-RVR-4-Amba) als effektiver Hemmstoff für Furin mit einem K_i -Wert von 0,81 nM heraus. Im Vergleich mit den bisher bekannten Inhibitoren, z. B. nona-D-Arginin (1,3 nM), ist ersichtlich, dass es sich hierbei um einen der wirksamsten, niedermolekularen Inhibitoren für diese Proproteinkonvertase handelt, die bis heute entwickelt wurden. Aufgrund der N-terminalen Acylierung und der fehlenden Carboxylgruppe am C-Terminus ist diese Verbindung zudem

3 Zusammenfassung und Ausblick

stabil gegen proteolytischen Abbau durch Amino- oder Carboxypeptidasen. Durch eine HPLC-Untersuchung einer Lösung dieses Inhibitors in Wasser über einen Zeitraum von 10 Tagen bei Raumtemperatur konnte kein Abbau des Wirkstoffes nachgewiesen werden. Daher wurde Inhibitor **17** für den weiteren Verlauf der Synthesen und Optimierungen als Leitstruktur ausgewählt.

3.1.2 P2- und P4-Gruppe

Anhand der Konsensussequenz der Furinsubstrate kann man erkennen, dass in der P2- bzw. der P4-Position nahezu immer Arginin oder Lysin lokalisiert ist. In der P4-Position wird sogar fast ausschließlich ein Arginin-Rest akzeptiert. Eine Begründung dafür findet sich in der Kristallstruktur des Furins im Komplex mit dem Referenzinhibitor (Abb. [2.17d auf Seite 56](#)): Die Guanidinogruppe des Arginins ist in der S4-Tasche mit allen Stickstoffatomen in ein Netzwerk aus Wasserstoff-Brückenbindungen mit Furin eingebunden. Dass der Austausch zu Lysin in dieser Position einen beträchtlichen Affinitätsverlust mit sich bringt (Faktor ~ 200), konnte im Verlauf der Arbeiten gezeigt werden. Es konnte ebenfalls bestätigt werden, dass in der P2-Position neben Arginin auch Lysin oder *homo*-Arginin akzeptiert wird, diese Derivate besitzen eine vergleichbare Furinhemmung. Der gänzliche Verlust der basischen Gruppe in P2-Position wird nicht toleriert, was durch Messungen mit Cbz-geschützten Lysin-Derivaten an dieser Position deutlich wurde.

3.1.3 P3-Gruppe

Für die P3-Position kann aus den bekannten Substrat- oder Inhibitorsequenzen keine klare Tendenz erkannt werden [[58](#), [59](#)]. Deshalb wurden dort alle proteinogenen Aminosäuren in die Inhibitorsequenz eingebaut, um die geeignetsten Reste für die gefundene Leitstruktur zu finden. Zusätzlich wurde eine ungewöhnliche Aminosäure mit einer kurzen, basischen Seitenkette eingeführt (Diaminopropansäure), da aufgrund der bekannten Kristallstruktur eine Interaktion mit Glu257 vermutet wurde. Die Messung der Inhibitoren zeigte, dass neben Valin ($K_i=0,81$ nM) die Aminosäuren Isoleucin, Phenylalanin sowie Tyrosin (0,84, 1,4 und 1,9 nM) als P3-Reste besonders geeignet sind. Der zusätzliche Einbau von basischen Resten (Arg/Lys), inklusive der Diaminopropansäure, hatte nicht den erwarteten positiven Effekt, diese Derivate waren etwas weniger wirksam. Die sauren Aminosäuren werden in P3-Position nicht akzeptiert, was anhand des stark negativ geladenen Oberflächenpotentials in der Region der S3-Bindetasche verständlich ist (vgl. Abb. [2.16 auf Seite 54](#)).

3.1.4 P5-Gruppe: Fettsäuren

Ein Ziel der Arbeit lag in der Entwicklung von Strukturen, die nicht nur in enzymkinetischen Untersuchungen eingesetzt werden können, sondern auch *in vivo* als Wirkstoffe verwendbar sind. Dazu wurden Optimierungen zur Verbesserung der Zellgängigkeit und der Stabilität durchgeführt. Aus der Literatur war bekannt, dass der Einbau von länger-kettigen Fettsäureresten in Wirkstoffstrukturen die Membrangängigkeit verbessern kann [118]. Vor diesem Hintergrund wurde bereits früher die Chlormethylketon-Ausgangsstruktur mit einem Decanoyl-Rest acyliert [116].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zur Leitstruktur 17 die mit einer Fettsäure acylierten Verbindungen bis zu einer Kettenlänge von 10 Kohlenstoffatomen ähnliche K_i -Werte aufweisen. Darüber hinaus verschlechterte sich die Effektivität der Inhibitoren schrittweise mit weiterer Verlängerung der Kohlenstoff-Kette. Aufgrund von unerwarteten Abweichungen in den Ergebnissen der enzymkinetischen Messungen wurde vermutet, dass sich in einigen Inhibitorlösungen, z. B. bei Stearoyl-RVR-4-Amba, Partikel oder mizelläre Strukturen ausbilden. Um dies zu bestätigen, wurden Streulichtmessungen zur Partikelgrößenbestimmung in diesen Lösungen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass der Einbau längerer Fettsäurereste in die Inhibitorstruktur tatsächlich zur Partikelbildung führt. Aufgrund der amphiphilen Eigenschaften solcher Verbindungen wird vermutet, dass es sich bei diesen Partikeln um Mizellen handelt.

Durch die Verwendung von ungesättigten Fettsäuren mit einer oder zwei Doppelbindungen in der Kohlenstoffkette sollte die Tendenz zur Ausbildung von Mizellen verhindert werden. Tatsächlich wurde nachgewiesen, dass im Falle des P5-Linoyl-Derivats (30, $K_i=5,4$ nM) erst bei sehr hohen Konzentrationen in Messpuffer ($> 20 \mu\text{M}$) der Nachweis von Partikeln möglich war (vgl. Abb. 2.9 auf Seite 38). Spätere Untersuchungen zur Zytotoxizität wiesen allerdings nach, dass einige dieser Verbindungen teilweise toxisch auf MDCK-Zellen wirken, vor allem die Derivate mit Stearin- oder Oleinsäureresten in P5-Position. Dennoch könnten die nicht-toxisch wirkenden Inhibitoren dieser Art in Zukunft eingesetzt werden, um Liposome zu generieren. Dies könnte eine Möglichkeit sein, um die Bioverfügbarkeit der Inhibitoren zu verbessern.

3.1.5 P5-Gruppe: basische Reste

Es ist bekannt, dass viele Furinsubstrate auch im Bereich von P5–P8 basische Aminosäurereste besitzen [58]. Da Furin auch von vielen multibasischen Verbindungen effektiv gehemmt wird [80, 81, 95], wurde vermutet, dass die inhibitorische Effektivität unse-

rer Leitstruktur durch basische Gruppen in der P5-Position ebenfalls gesteigert werden kann. Daher wurde eine weitere Inhibitorserie mit basischen P5-Resten synthetisiert. Obwohl dadurch die generelle Basizität weiter erhöht wird, gibt es Beispiele dafür, dass solche multibasischen Strukturen eine relativ hohe Zellgängigkeit aufweisen können, z. B. das nona-D-Arginin oder Sequenzen des zellpenetrierenden HIV-Tat-Proteins [127–130]. Denkbar ist ebenfalls die Aufnahme in die Zelle durch Furin selbst, da es zur Membran transportiert und anschließend wieder in die Zelle aufgenommen wird (vgl. Abb. 1.5 auf Seite 11). Bindet der Wirkstoff extrazellulär an Furin, könnte er demzufolge gemeinsam mit dem Enzym in die Zelle transportiert werden.

Durch die Einführung eines *o*-, *m*- oder *p*-Aminomethylphenylelessigsäure-Restes in P5-Position wurden einige Inhibitoren mit endständiger Aminogruppe synthetisiert, die anschließend noch in die Guanidino-Derivate umgewandelt wurden. Erste Messungen der Restaktivität des Furins mit diesen Inhibitoren in enzymkinetischen Tests zeigten eine derart starke Hemmwirkung, dass die Bestimmung ihrer K_i -Werte unter „tight-binding“-Bedingungen durchgeführt werden musste. Für diese Art Messungen ist die Kenntnis der Enzymkonzentration notwendig. Für die Bestimmung der Furinkonzentration wurde eine in der Literatur bereits beschriebene „active-site“-Titration mit dem Referenzinhibitor durchgeführt [76]. Der Inhibitor erwies sich jedoch als instabil in Puffer, so dass die Auswertung keine exakten Daten lieferte. Daher wurden die hochwirksamen Inhibitoren unter Verwendung einer nach Stone und Hofsteenge angepassten „tight-binding“-Gleichung (Gl. (4.4), auf Seite 85), bei der die Enzymkonzentration mit einem variablen Faktor versehen ist, ausgewertet [139]. Die ermittelten K_i -Werte der Verbindungen liegen alle im picomolaren Bereich. Die effektivsten Wirkstoffe dieser Serie besitzen eine Guanidinomethyl-Gruppe in *meta* (**38**, 5,6 pM) bzw. in *para*-Position (**40**, 14 pM) der P5-Phenylelessigsäure. Diese Verbindungen sind die bisher wirksamsten, reversibel bindenden, niedermolekularen Furininhibitoren.

3.2 Untersuchungen zur Zytotoxizität und Virusvermehrung

Um Wirkstoffe in virologischen Zelltests einsetzen zu können, ist es erforderlich, im Vorfeld Untersuchungen zu ihrer Zytotoxizität durchzuführen. Bei toxischen Wirkstoffen lässt sich sonst die Ausbreitung der sich nur auf lebenden Zellen vermehrenden Viren nicht korrekt bestimmen. In enger Kooperation mit der AG Garten wurden entsprechende Untersuchungen durchgeführt, bei denen die Toxizität der Inhibitoren auf MDCK-Zellen getestet

wurde. Bei einigen der wirksamsten Verbindungen (u.a. **17**, **32** und **40**) konnte dabei kein signifikanter toxischer Effekt im relevanten Konzentrationsbereich nachgewiesen werden.

Daher wurden diese Verbindungen eingesetzt, um sie auf die Hemmwirkung in Bezug auf die Ausbreitung von hochpathogenen Geflügelpestviren (H7N1) zu testen. Dabei konnte zunächst festgestellt werden, dass durch diese Inhibitoren die Hämagglutininspaltung des Virus gehemmt wird. Für Inhibitor **17** wurde ein IC_{50} -Wert von 10 μ M ermittelt, während für die in P5-Position guanylierten Inhibitoren **32** und **40** Werte von 25–50 μ M bzw. zwischen 1 und 10 μ M bestimmt wurden. In weiteren Experimenten wurde die Wirkung der Inhibitoren auf die multizyklische Vermehrung der Viren untersucht. Im Vergleich zur Kontrolle ohne Wirkstoff konnte dabei Inhibitor **17** die Vermehrung der Viren um 24 h verzögern, während Verbindung **40** die Virusausbreitung um weitere ~ 22 h verlangsamen konnte. Im Gegensatz zu diesem Test, bei dem die Anzahl aller Viruspartikel nach einer gewissen Zeit bestimmt wird, wurde auch die Vermehrung ausschließlich infektiöser Viruspartikel nach Zugabe der Wirkstoffe untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass Inhibitor **40** die Virusvermehrung exzellent hemmen kann und die Virusanzahl nach 45 h nur ca. 1,7 % der Kontrolle ohne Inhibitor erreicht.

3.3 Biotinylierte Derivate und AMC-Substrate

Um eine Reinigung von rekombinant hergestelltem Furin zu vereinfachen, sind in dieser Arbeit biotinylierte Verbindungen auf Basis der entwickelten Inhibitorstrukturen synthetisiert worden. In Zusammenarbeit mit der AG Than sind diese Verbindungen an kommerziell erhältliche Streptavidin-Säulen gebunden und für die Reinigung von Furin eingesetzt worden. In einem Optimierungsprozess wurden mehrere Derivate synthetisiert, von denen sich letztendlich Verbindung **81** als geeignet erwies, um Furin zu reinigen.

Schließlich wurden im Rahmen dieser Arbeit noch zwei AMC-Substrate synthetisiert. Ausgehend von der Inhibitorstruktur entstanden so die beiden Verbindungen Ac- bzw. Phac-RVRR-AMC. Enzymkinetische Untersuchungen mit Furin zeigten, dass das Phenylacetyl-Derivat basierend auf den k_{cat}/K_m -Werten unter den gewählten Bedingungen etwas effektiver als das kommerziell erhältliche Substrat Pyr-RTKR-AMC gespalten wird. Zudem lässt sich dieses Substrat durch den Einsatz einer Kombination aus Lösungs- und Festphasenpeptidsynthese einfach synthetisieren und ist dadurch eine Alternative für kommende enzymkinetische Messungen.

3.4 Zukünftige Möglichkeiten

Die im Laufe dieser Arbeit entwickelten Verbindungen sind hoch wirksame Inhibitoren für die Propeptidkonvertase Furin. Die hohe Aktivität der Wirkstoffe eröffnet deshalb die Möglichkeit, die Strukturen weiter zu vereinfachen, auch wenn dies mit einem gewissen Aktivitätsverlust verbunden sein sollte. Da die hier vorgestellten Pentapeptid-Mimetika ein relativ großes Molekulargewicht aufweisen, könnte eine mögliche Strategie darin bestehen, auf den P5-Rest zu verzichten und die im Rahmen der Arbeit genutzten N-terminalen Arginimimetika direkt in P4-Position einzubauen. Da bekannt ist, dass auch Verbindungen wie nona-D-Arginin durchaus von Zellen aufgenommen werden, wäre andererseits auch denkbar, die bisher identifizierten Leitstrukturen noch um weitere basische Reste zu verlängern.

Um die Basizität der Wirkstoffe zu verringern, wurde Citrullin in die P4-Position eingebaut. Dies reduzierte die inhibitorische Wirkung enorm, da Arginin in dieser Position unbedingt erforderlich ist. Dennoch kann die Synthese von Derivaten mit geringerer Basizität von Vorteil sein, um deren Bioverfügbarkeit perspektivisch zu verbessern.

Die wirksamsten Inhibitoren für Furin sind die Derivate mit einer zusätzlichen Guanidinogruppe in P5-Position. Diese Inhibitoren werden derzeit noch auf ihre Wirkung im Hinblick auf ihre Hemmung auf andere furinartige Propeptidkonvertasen untersucht¹, die Daten liegen im jedoch noch nicht vor.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten, niedermolekularen Verbindungen die wirksamsten reversiblen Furinhemmstoffe sind, die bisher weltweit entwickelt wurden. Deshalb sind diese Inhibitoren für weiterführende Untersuchungen in Zellkulturen oder gegebenenfalls sogar in Tiermodellen geeignet.

¹In Zusammenarbeit mit der AG Day.

4 Experimenteller Teil

4.1 Material und Methoden

4.1.1 Peptidsynthese

Manuelle Peptidsynthesen wurden entweder an einem Schüttler (Ika, Staufen, Deutschland) in Polypropylen-Spritzen (Intavis, Köln, Deutschland) ausgestattet mit Teflonfritten oder einem Drehschüttler in Reaktionsgefäßen aus Glas mit eingeschmolzener Sinterfritte durchgeführt. Die automatische Festphasenpeptidsynthese erfolgte nach einem Standard-Fmoc-Protokoll mit einem Syro 2000 (MultiSynTech GmbH, Witten, Deutschland).

4.1.2 HPLC und Lyophilisierung

Analytische HPLC

Alle analytischen HPLC-Chromatogramme wurden an einer Anlage der Firma Shimadzu (System LC-10A, Säule: Nucleodur C18, 5 μ m, 100 Å, 4.6×250 mm, Machery-Nagel, Düren, Deutschland) unter Verwendung eines linearen Gradienten aus Acetonitril als Elutionsmittel (1-70 % in 69 min, Detektion bei 220 nm) und Wasser mit jeweils 0,1 % TFA bei einer Flussrate von 1 mL/min aufgenommen. Chromatogramme zur Reaktionskontrolle wurden an einer Merck-Hitachi Anlage (L 5000 LC Controller, 655 A-12 Pumpe, L 3000 Photo-Dioden-Array Detektor und D-2500 Chromato-Integrator) unter Verwendung eines linearen Gradienten aus Acetonitril als Elutionsmittel (1-81 % in 8 min, Detektion bei 220 nm) und Wasser mit jeweils 0.1 % TFA bei einer Flussrate von 1,5 mL/min und unter Einsatz einer Chromolith[®] Fast Gradient Säule, RP-18e, 50-2 mm (Merck, Darmstadt, Deutschland) aufgenommen.

Präparative HPLC

Die finale Reinigung aller Verbindungen erfolgte zu $\geq 95\%$ Reinheit (Detektion bei 220 nm) mittels einer präparativen HPLC (Pumpen: Varian PrepStar Modell 218 Gradientensystem, Detektor: ProStar Modell 320, Fraktionskollektor: Varian Modell 701) mit einer C8 Säule (Nucleodur, 5 μ m, 100 Å, 32x250 mm, Macherey-Nagel, Düren, Deutsch-

4 Experimenteller Teil

land) unter Verwendung eines linearen Gradienten aus Acetonitril als Elutionsmittel und Wasser mit jeweils 0.1 % TFA bei einer Flussrate von 20 mL/min.

Lyophilisation

Die Inhibitoren wurden als TFA-Salze nach Lyophilisation aus 80 % *t*-Butanol in demin. H₂O an einer Gefriertrocknungsanlage (Alpha 2-4 LDplus, Christ, Osterode am Harz, Deutschland) erhalten.

4.1.3 NMR- und Massenspektroskopie

¹H- und ¹³C-Spektren wurden an einem ECX-400 (Jeol Inc., USA) bei 400 bzw. 100 MHz aufgenommen. Die Referenzierung erfolgte durch interne Lösungsmittelsignale. Die molekulare Masse der synthetisierten Verbindungen wurde mit einem QTrap 2000 ESI Massenspektrometer (Applied Biosystems, USA) bestimmt.

4.1.4 Reagenzien

Chemikalien, Kopplungsreagenzien und Boc/Fmoc-Aminosäure-Derivate für die Peptidsynthese wurden von den Firmen Orpegen (Heidelberg, Deutschland), Novabiochem (Darmstadt, Deutschland), Iris (Marktredwitz, Deutschland), Sigma-Aldrich (Seelze, Deutschland), Acros (Geel, Belgien), Merck (Darmstadt, Deutschland), PolyPeptide (Straßburg, Frankreich) oder Pentapharm (Basel, Schweiz) bezogen.

4.2 Enzymkinetik

4.2.1 Standardbestimmung der Inhibitoraktivität

Die Hemmkonstanten der synthetisierten Inhibitoren für humanes Furin [81] wurden bei Raumtemperatur in einem Fluoreszenz-Plattenleser der Marke Safire II (Tecan, Schweiz, $ex = 380$ nm, $em = 460$ nm) unter Verwendung von pyroGlu-RTKR-AMC als Substrat (Bachem, Schweiz) in 100 mM HEPES Puffer bei pH 7,0 mit 0.2 % Triton X-100, 2 mM CaCl₂, 0,02 % Natriumazid und 1 mg/mL BSA bestimmt [111]. Die Enzymkonzentration im Ansatz betrug 0,95 nM (basierend auf der Bestimmung des Proteingehaltes bei einem Molekulargewicht von 70 kDa), während die verwendeten Substratkonzentrationen 3,25, 13 und 35,5 μ M betrugen; in einigen Fällen wurde eine vierte Konzentration von 8,12 μ M eingesetzt. Bei jeder Bestimmung der Hemmkonstanten wurde zusätzlich

die Furinaktivität in Abwesenheit eines Inhibitors über mehrere Substratkonzentrationen hinweg gemessen und so die kinetischen Parameter K_m und V_{\max} erhalten.

In der Regel wurden die Inhibitorkonzentrationen im Messansatz so gewählt, dass die niedrigste Konzentration mindestens 10-fach höher als die Enzymkonzentration war und um mehr als eine Größenordnung variiert wurde. Sämtliche in der Arbeit angegebenen Inhibitorkonzentrationen aus den enzymkinetischen Messungen, die berechneten Hemmkonstanten und IC_{50} -Werte beruhen ausschließlich auf den Einwaagen, wobei für die Molekulargewichtsberechnung der Hemmstoffe je basische Gruppe genau ein Molekül Trifluoressigsäure addiert wurde. Der gesamte Messansatz ist in Tabelle 4.2 zusammengestellt.

Tabelle 4.2: Messansatz des Standardenzymtests. Dieser Ansatz wurde auch für die Bestimmung der IC_{50} -Werte und der „tight-binding“-Inhibitoren eingesetzt. Es wurden für die Messung F96 MaxiSorp-Platten (Nunc, Langenselbold, Deutschland) verwendet. Die Messungen wurden mit der Zugabe von Furin zum Rest des Ansatzes gestartet.

Volumen (μL)	Reagenz
x^a	Inhibitor in Puffer
y	Puffer
20	Substrat in Wasser
20	Furin in Puffer
200	Gesamtvolumen

^a $x + y = 160 \mu\text{L}$

Aus den erhaltenen Zeit-Umsatz-Kurven wurde über lineare Regression die „steady-state“-Geschwindigkeit v ermittelt und die Werte dann an die Gleichung für kompetitive Hemmung über alle Substratkonzentrationen hinweg angepasst:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot S}{K_m \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + S} \quad (4.1)$$

Zusätzlich wurden die Hemmkonstanten nach der Methode von Dixon [110] bestimmt.

4.2.2 Bestimmung der IC_{50} -Werte

Für die Bestimmung der IC_{50} -Werte wurden 8 Messwerte im gleichen Konzentrationsbereich wie bei den Standardbestimmungen aufgenommen, die Messbedingungen waren identisch zu denen im Standard-Test. Zusätzlich wurden je 8 Werte unter- und oberhalb dieses Konzentrationsbereiches gemessen, so dass eine gute Anpassung an Gleichung (4.2) [162, 163] erfolgen konnte (mit A_1 als oberer Grenze, A_2 als unterer Grenze und p als Steilheit der Kurve):

$$v = A_2 + \frac{(A_1 - A_2)}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50}}\right)^p} \quad (4.2)$$

4.2.3 „Active-site“-Titration

Um die Konzentration des aktiven Enzyms unter Standard-Messbedingungen (siehe Abschnitt 4.2.1 auf Seite 82) zu ermitteln, wurde eine „active-site“-Titration nach einer bereits beschriebenen Methode [76] mit dem irreversiblen Inhibitor Decanoyl-RVKR-chlormethylketon im Bereich von 0–3,72 nM durchgeführt. Dieser wurde zum Zeitpunkt t_0 zu Furin in Puffer gegeben und die Messung mit Substrat in der Konzentration 8,125 μM zu unterschiedlichen Zeiten t_n zwischen 0 und 24 h gestartet. Aus den erhaltenen Zeit-Umsatz-Kurven wurde über lineare Regression die Restaktivität v ermittelt und gegen die Inhibitorkonzentration aufgetragen. Die erhaltenen Kurven wurden im linearen Bereich nahe der Ordinate durch lineare Regression auf die Abszisse extrapoliert und aus dem Schnittpunkt die Enzymkonzentration ermittelt (vgl. Abbildung 2.10 auf Seite 41 und 2.11 auf Seite 42).

4.2.4 „Tight-binding“-Kinetik

Um Hemmkonstanten zu bestimmen, die im Bereich der verwendeten Enzymkonzentration lagen, wurden von den entsprechenden Inhibitoren Messungen unter „tight-binding“-Bedingungen durchgeführt. Dazu wurde eine Substratkonzentration von 8,125 μM unter Standardbedingungen (siehe oben) verwendet. Die Inhibitorkonzentrationen im Messansatz wurden im Bereich von 0,001–0,016 μM ausgewählt. Aus den erhaltenen Zeit-Umsatz-Kurven wurde v ermittelt und als Funktion der Inhibitorkonzentration I_t aufgetragen. Unter Verwendung der Gleichung für „tight-binding“-Bedingungen (4.3) [132, 164–166] und der durch „active-site“-Titration ermittelten Enzymkonzentration konnte keine optimale Kurvenanpassung erhalten werden (wobei E_t die Enzymkonzentration im Ansatz, v_0 die Geschwindigkeit ohne Inhibitor, I_t die totale Inhibitorkonzentration und K_{i^*} die apparente Hemmkonstante ist).

$$v = v_0 \cdot \frac{[(K_{i^*} + I_t - E_t)^2 + 4K_{i^*} \cdot E_t]^{\frac{1}{2}} - (K_{i^*} + I_t - E_t)}{2E_t} \quad (4.3)$$

Durch die Unsicherheit in der Bestimmung der Enzymkonzentration, die vor allem durch den vorhandenen Abbau des Decanoyl-RVKR-chlormethylketons (für Details sie-

4.3 Stabilitätsuntersuchungen der Inhibitoren in Zellkultur

he Abschnitt 2.2.4 auf Seite 40) bedingt ist, wurde eine Anpassung der Kurven an eine nach Stone und Hofsteenge veränderte Gleichung (4.4), bei der E_t anstelle von I_t mit einem zusätzlichen Faktor x versehen ist, vorgenommen [139].

$$v = v_0 \cdot \frac{[(K_{i^*} + I_t - xE_t)^2 + 4K_{i^*} \cdot xE_t]^{\frac{1}{2}} - (K_{i^*} + I_t - xE_t)}{2xE_t} \quad (4.4)$$

Es zeigte sich, dass bei Verwendung dieser Gleichung einerseits eine sehr gute Anpassung der Messergebnisse möglich ist und andererseits für $x \cdot E_t$ eine Enzymkonzentration von $\sim 0,95$ nM in den Berechnungen erhalten werden konnte, die mit dem berechneten Wert aus der Proteinbestimmung übereinstimmt. Um den wahren K_i -Wert aus dieser Anpassung zu ermitteln, wurde der apparente K_{i^*} -Wert noch um den Substratschutzterm korrigiert:

$$K_i = \frac{K_{i^*}}{1 + \frac{S}{K_m}} \quad (4.5)$$

4.3 Stabilitätsuntersuchungen der Inhibitoren in Zellkultur

Zur Bestimmung der Stabilität von ausgewählten Inhibitoren (34 und 40) wurde zunächst eine Eichkurve der verwendeten Inhibitoren gemessen. Dazu wurden die Inhibitoren zu 0,5 mg/mL in demin. Wasser gelöst und Proben zu je 0,5, 1, 2,5, 3,5, 4,5, 6, und 7,5 μ g über HPLC analysiert (HPLC-Methode siehe Abschnitt 4.1.2 auf Seite 81).

Für die Inkubation wurden MDCK-Zellen in 96er Platten mit DMEM eingesetzt und bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.¹ Bei einer Konfluenz von ~ 90 % wurden die entsprechenden Inhibitor-Stammlösungen (10 mM in DMSO) mit DMEM verdünnt und zu finalen Konzentrationen von 10 μ M und 30 μ M zum Ansatz zugegeben. Proben ohne Zellen wurden identisch behandelt. Nach 0, 24, 48, 72 und 96 h wurde aus dem Medium Aliquote entnommen, bei 30 000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die Überstände wurden bis zur Vermessung bei -80 °C gelagert. Direkt vor der Analyse über HPLC wurden die Proben erneut 15 min und 4 °C bei 13 000 rpm zentrifugiert und je 100 μ L injiziert. Die Auswertung der erhaltenen Chromatogramme erfolgte durch direkten Vergleich der Peakflächen mit den aus der Eichkurve erhaltenen Werten.

¹Durchgeführt von Yinghui Lu, AG Garten, Virologisches Institut der Philipps-Universität Marburg.

4.4 Synthese der Inhibitoren

4.4.1 Allgemeines

Die Synthese der Verbindungen erfolgte durch eine Kombination aus Festphasenpeptidsynthese (SPPS) und Lösungssynthese. Alle finalen Inhibitoren wurden mittels präparativer HPLC gereinigt, aus 80 % *t*-BuOH in Wasser lyophilisiert und als weiße Pulver in Form der TFA-Salze erhalten. Da größtenteils die Zwischenprodukte am Harz gebunden vorlagen oder direkte Synthesen im Anschluss erfolgten, beruhen die Syntheseberechnungen nachgeschalteter Reaktionen auf der ursprünglich maximal möglichen Harzbeladung entsprechend der Angaben der Hersteller.

4.4.2 Generelle Methoden

Methode A: Festphasenpeptidsynthese

Für die automatisierte Synthese wurden ca. 100 mg trockenes Harz in 2 mL Spritzen mit PTFE-Fritte eingewogen. Die Programmschritte des ersten bzw. des *n*-ten Zyklus sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst. Die Kopplungen wurden doppelt, unter Einsatz eines 4-fachen Überschusses an Aminosäure, HOBt und HBTU sowie eines 8-fachen Überschusses an DIPEA in DMF bezogen auf die maximale Harzbeladung, durchgeführt. Nach Beendigung der Synthese wurde das Harz gründlich gewaschen (3–4× DMF, 3–4× DCM) und *in vacuo* getrocknet, soweit nicht anders angegeben.

Die manuelle Festphasensynthese wurde analog durchgeführt. Für die Fmoc-Abspaltung wurde 20%ige Lösung aus Piperidin in DMF (v/v) verwendet. Die Reaktionen wurden in einem Reaktionsgefäß aus Glas mit eingeschmolzener Glassinterfritte durchgeführt. Im Gegensatz zur automatischen Synthese wurden nur Einfachkopplungen pro Reaktion angesetzt.

Für die Festphasenpeptidsynthese wurden die Fmoc-Standardamino­säuren mit orthogonalem, säurelabilem Seitenkettenschutz und freiem C-Terminus verwendet. Eine Liste der Aminosäurederivate befindet sich in Tabelle 4.4 auf Seite 88.

Methode B: Beladung von 2Cl-Tritylchlorid Harz (2Cl-Trt-Cl)

Die für die Beladung vorgesehene Fmoc-Aminosäure wurde in 1 mL trockenem DCM pro 0,1 g Harz gelöst und zu 1 eq des trockenen Harzes gegeben (Beladung 1,55 mmol/g). Nach kurzem Mischen wurden 4 eq DIPEA direkt zu der Suspension gegeben. Nach 2 h Reaktion bei RT unter Schütteln wurde die Reaktionslösung abgesaugt und das Harz 3×1 min mit DCM/MeOH/DIPEA, 17:2:1 (v/v/v), behandelt. Es folgte mehrmaliges Wa-

Tabelle 4.3: Programm für die automatische SPPS (für Kopplungsbedingungen siehe Text).

Erster Zyklus				
Schritt	Aktion	Reagenzien	Zyklen	Zeit (min)
1	Quellen	DMF	2	10
2	Fmoc-Abspaltung	Piperidin/DMF/NMP ^a	2	5+25
3	Waschen	DMF	5	1
4	Waschen	NMP	2	1
5	Kopplung	AS/HOBt/HBTU/DIPEA ^b	2	95
6	Waschen	DMF	2	1
n-ter Zyklus				
Schritt	Aktion	Reagenzien	Zyklen	Zeit (min)
1	Waschen	DMF	2	1
2	Fmoc-Abspaltung	Piperidin/DMF/NMP ^a	2	5+15 ^c
3	Waschen	DMF	5	1
4	Waschen	NMP	2	1
5	Kopplung	AS/HOBt/HBTU/DIPEA ^b	2	95
6	Waschen	DMF	2	1

^a im Verhältnis 1:1:1, (v/v/v), versetzt mit Triton-X 100, 1 % (w/v) [167] ^b im Molverhältnis 4:4:4:8, bezogen auf die Maximalbeladung des Harzes ^c ab 10. Zyklus: 20 min bei der 2. Abspaltung

schen mit DCM, DMF und erneut DCM. Das beladene Harz wurde dann *in vacuo* getrocknet.

Methode C: Beladung von Tritylchlorid-Harz

4 eq des entsprechenden Diamins wurden in 1,5 mL trockenem THF pro 0,1 g Harz (Beladung 1,5 mmol/g) gelöst und zu 1 eq des trockenen Harzes gegeben (Beladung 1,5 mmol/g). Nach 2 h Reaktion bei RT unter Schütteln wurde die Reaktionslösung abgesaugt und das Harz 3×1 min mit DCM/MeOH/DIPEA, 17:2:1 (v/v/v), behandelt. Anschließend folgte mehrmaliges Waschen jeweils mit DCM, DMF und erneut mit DCM (mindestens je 3×) und Trocknung des beladenen Harzes *in vacuo*.

Methode D: Abspaltung vom Harz unter Erhalt aller Schutzgruppen

Nach erfolgter SPPS wurde das harzgebundene Peptid mit 1 % TFA in DCM (1,5 mL/0,1 g unbeladenem Harz) für 0,5 h geschüttelt. Die Reaktionslösung wurde anschließend abgesaugt und direkt vom Lösemittel *in vacuo* befreit. Um eine vollständige Harzabspaltung zu erreichen wurde die Prozedur unter denselben Bedingungen wiederholt. Die Rückstände wurden vereint und im HV getrocknet.

4 Experimenteller Teil

Tabelle 4.4: Verwendete Fmoc-Aminosäurederivate für die SPPS. Die Angabe der Schutzgruppe bezieht sich auf die Seitenkette; der N-Terminus war bei allen AS Fmoc-geschützt.

1-Buch- staben Code	3-Buch- staben Code	Aminosäure	Schutz- gruppe	Molekularge- wicht (g/mol)
A	Ala	L-Alanin · H ₂ O	—	329,4
C	Cys	L-Cystein	Trt	585,7
D	Asp	L-Asparaginsäure	OtBu	411,5
E	Glu	L-Glutaminsäure · H ₂ O	OtBu	443,5
F	Phe	L-Phenylalanin	—	387,4
G	Gly	L-Glycin	—	297,3
H	His	L-Histidin	Trt	619,7
I	Ile	L-Isoleucin	—	353,4
K	Lys	L-Lysin	Boc	468,5
L	Leu	L-Leucin	—	353,4
M	Met	L-Methionin	—	371,5
N	Asn	L-Asparagin	Trt	596,7
P	Pro	L-Prolin	—	337,4
Q	Gln	L-Glutamin	Trt	610,7
R	Arg	L-Arginin	Pbf	648,8
S	Ser	L-Serin	tBu	383,4
T	Thr	L-Threonin	tBu	397,5
V	Val	L-Valin	—	339,4
W	Trp	L-Tryptophan	Boc	526,6
Y	Tyr	L-Tyrosin	tBu	459,6
—	Dap	L-2,3-Diaminopropionsäure	Boc	426,47
—	—	L-N-(Methyl)arginin	Mtr	622,74
—	Cit	L-Citrullin	—	397,43
r	dArg	D-Arginin	Pbf	648,8

Methode E: 4-(Amidino)benzylamin-Kopplung

Um 4-Amba an einen freien C-Terminus zu koppeln, wurden 1 eq 4-Amba, 1,1 eq PyBOP, 3 eq 6-Cl-HOBt und 7 eq DIPEA zu 1 eq des Rohpeptides (bezogen auf die Ursprungsbeladung des Harzes) gegeben und in 1 mL DMF pro 0,1 mmol gelöst. Nach 1 h Rühren bei RT wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das Peptid im Anschluss im HV getrocknet.

Methode F: Vollständige Harz- und Schutzgruppenabspaltung

Für eine Harzabspaltung bei gleichzeitiger Entfernung sämtlicher Schutzgruppen wurde das Harz mit 5 mL einer Lösung aus TFA/TIS/H₂O, 95:2,5:2,5 (v/v/v), pro 0,15 mmol Ursprungsbeladung versetzt und bei RT über 2–3 h geschüttelt. Die Reaktionslösung wur-

de anschließend in 10-fachen Überschuss kalten Ethers eingetropft. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Peptid zweimal mit kaltem Ether gewaschen. Anschließend wurde der Rückstand *in vacuo* getrocknet. Bei Unvollständigkeit der Abspaltung der Schutzgruppen (HPLC-Kontrolle) wurde diese Prozedur (bei 40° C) wiederholt.

Methode G: Guanylierung

Nach Abspaltung aller Schutzgruppen wurde das Rohpeptid in 1 mL 1 M Na₂CO₃ pro 0,15 mmol maximaler Harzbeladung mit 3 eq 1-*H*-Pyrazolcarboxamidin·HCl und 4 eq DIPEA versetzt. Die Lösung wurde 16 h bei RT geschüttelt und der Reaktionsverlauf über HPLC kontrolliert. Zeigte die Kontrolle eine unvollständige Reaktion, so wurden erneut 3 eq 1-*H*-Pyrazolcarboxamidin·HCl und 4 eq DIPEA zugegeben und 16 h geschüttelt. Das Produkt wurde nach vollständiger Reaktion direkt aus der Lösung über präparative HPLC gereinigt.

Die Guanylierung bedarf im Grundsatz keiner Hilfsbase, daher wurden auch Varianten ohne DIPEA und mit 0,5 M Na₂CO₃ als Lösungsmittel durchgeführt [109]. Die Methode mit Zugabe von DIPEA wurde allerdings bei allen Verbindungen außer **38** angewandt.

4.4.3 Synthese der Vorstufen

4-(Amidino)benzylamin·2 HCl (**1**)

10 g (32 mmol) Boc-4-acetylhydroxyamidino-benzylamid [143] wurden in 500 mL 90 % Essigsäure gelöst und mit 650 mg Palladium auf Aktivkohle (10 % Pd/C) unter N₂-Atmosphäre versetzt. Die Lösung wurde unter Rühren für 48 h mit H₂ hydriert. Anschließend wurde der Katalysator abfiltriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand, Boc-4-amidinobenzylamid·Acetat, wurde in 150 mL Wasser gelöst und mit 40 mL konzentrierter HCl versetzt. Nach 1,5 h Rühren bei RT wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und anschließend der Rückstand aus reinem Wasser lyophilisiert.

Ausbeute: 6,8 g, 30,6 mmol, weißes Pulver; MS ber. m/z: 149,09, MS gef. m/z: 150,0 (M+H)⁺; 1-H-NMR: 400 MHz, D₂O [ppm]= 4,46 (s, 2 H), 7,80-8,01 (2d, 4 H, aromatisch); 13C-NMR (100 Mhz, D₂O): [ppm]= 42.64 (CH₂), 128.65, 129.26, 129.62, 138.69 (aromatisch), 166.47 (Amidino-Kohlenstoff).

4 Experimenteller Teil

Phac-Arg(Pbf)-Val-Arg(Pbf)-OH (**2a**)

2Cl-Trt-Cl-Harz wurde mit Fmoc-Arg(Pbf)-OH (1,509 g, 2,325 mmol, 1 eq) nach Methode **B**² beladen. Die Aminosäurederivate und die Phenyllessigsäure wurden mittels eines manuellen Syntheseprotokolls gekoppelt (**A**). Nach Abspaltung (Methode **D**) wurde das seitenkettengeschützte Peptid erhalten, welches anschließend mittels präparativer HPLC gereinigt und dann lyophilisiert wurde.

Ausbeute: 1,253 g, 1,2 mmol, weißes Pulver; Reinheit > 97 % (HPLC); t_R : 64,6 min; MS ber. m/z: 1051,49, MS gef. m/z: 1052,5, (M+H)⁺.

Ac-Arg(Pbf)-Val-Arg(Pbf)-OH (**2b**)

Die Synthese verlief analog zu Verbindung **2a**, außer dass für die Kopplung der P5-Position Essigsäure eingesetzt wurde.

Ausbeute: 1,377 g, 1,4 mmol, weißes Pulver; Reinheit > 97 % (HPLC); t_R : 57,5 min; MS ber. m/z: 975,46, MS gef. m/z: 976,4, (M+H)⁺.

4.4.4 Synthese von Ac-Arg-Val-Arg-P1

Ein allgemeines Syntheschema der Verbindungen **3–8**, **11** und **12** befindet sich im Ergebnisteil, Abbildung 2.1 auf Seite 23.

Ac-Arg-Val-Arg-4-(amido)butylamin · 3 TFA (**3**)

An das mit Diaminobutan (60,1 μ L, 0,6 mmol) beladene Trt-Cl-Harz (**C**, 0,1 g) wurden die Aminosäuren durch automatische SPPS gekoppelt (**A**); die Kopplung von Essigsäure erfolgte nach dem gleichen Prinzip. Nach Abspaltung der Schutzgruppen (**F**) wurde das Produkt über präparative HPLC gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 30 mg, weißes Pulver; t_R : 13,64 min; MS ber. m/z: 541,69, MS gef. m/z: 542,21 (M+H)⁺.

Ac-Arg-Val-Arg-4-(amido)butylguanidin · 3 TFA (**4**)

Die Synthese erfolgte analog zu Verbindung **3**, das nach Abspaltung erhaltene Rohpeptid wurde jedoch nicht gereinigt, sondern direkt in das Guanidin überführt (**G**) und anschließend durch präparative HPLC gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 28 mg, weißes Pulver; t_R : 15,86 min; MS ber. m/z: 583,73, MS gef. m/z: 195,45 (M+3H)³⁺/3.

²Im Folgenden werden die verwendeten Methoden in fettgedruckten Großbuchstaben angegeben. Die Synthesebeschreibungen befinden sich in Abschnitt 4.4.2 auf Seite 86.

4.4.5 Synthese von Phac-Arg-Val-Arg-P1

Phac-Arg-Val-Arg-3-(amido)propylamin · 3 TFA (**5**)

Trt-Cl-Harz (0,1 g) wurde mit 1,3-Diaminopropan (50,03 μ L, 0,6 mmol) beladen (**C**) und die Aminosäuren durch automatische SPPS gekoppelt (**A**), wobei Phenyllessigsäure wie eine Aminosäure behandelt wurde. Nach Abspaltung vom Harz (**F**) wurde das Rohprodukt mittels präparativer HPLC gereinigt und anschließend lyophilisiert.

Ausbeute: 39 mg, weißes Pulver; t_R : 22,2 min; MS ber. m/z: 603,4, MS gef. m/z: 604,57 (M+H)⁺.

Phac-Arg-Val-Arg-3-(amido)propylguanidin · 3 TFA (**6**)

Das Rohprodukt **5** wurde nach Methode **G** guanyliert und das Produkt nach präparativer HPLC lyophilisiert.

Ausbeute: 40 mg, weißes Pulver; t_R : 23,4 min; MS ber. m/z: 645,42, MS gef. m/z: 646,55 (M+H)⁺.

Synthese der Verbindungen **7–14**

Die Synthese analoger Strukturen mit einem Amin oder Guanidin in P1-Position erfolgte nach dem gleichen Schema wie für Verbindung **5** und Verbindung **6** beschrieben. Für die Harzbeladung wurde entsprechend 1,4-Diaminobutan, 1,5-Diaminopentan, *m*-Xylylendiamin oder *p*-Xylylendiamin eingesetzt. Die Analytik wird in Tabelle 4.5 aufgeführt. Ein allgemeines Syntheschema der Verbindungen **15–17** befindet sich im Ergebnisteil, Abbildung 2.2 auf Seite 26.

Tabelle 4.5: Synthese der Verbindungen **7–14**. Die Synthesedurchführung und -beschreibung entspricht der von Verbindung **5** bzw. der von Verbindung **6** für die guanylierten Inhibitoren. Die Strukturen befinden sich in Tabelle 2.1 auf Seite 24.

Nr.	Phac-RVR-... · 3 TFA	Ausbeute (mg) ^a	HPLC (min)	MS ber.	MS gef.
7	4-(amido)butylamin	14	22,4	617,79	309,7 ^b
8	5-(amido)pentylamin	35	23,4	631,43	632,6 ^c
9	3-(amidomethyl)benzylamin	38	25,2	665,41	333,7 ^b
10	4-(amidomethyl)benzylamin	20	24,7	665,41	333,7 ^b
11	4-(amido)butylguanidin	31	23,9	659,83	660,4 ^c
12	5-(amido)pentylguanidin	9	25,2	673,45	674,8 ^c
13	3-(amidomethyl)benzylguanidin	31	26,7	707,43	708,6 ^c
14	4-(amidomethyl)benzylguanidin	15	25,9	707,43	354,7 ^b

^a je 0,1 g Tritylchlorid-Harz ^b (M+2H)²⁺/2 ^c (M+H)⁺

4 Experimenteller Teil

Phac-Arg-Val-Arg-4-(amidomethyl)piperidin · 3 TFA (**15**)

Verbindung **2a** (105,2 mg, 0,1 mmol, 1 eq), 1-Boc-4-(aminomethyl)piperidin (21,43 mg, 0,1 mmol, 1 eq), PyBOP (57,3 mg, 0,11 mmol, 1,1 eq), 6-Cl-HOBt (20,9 mg, 0,3 mmol, 3 eq) und DIPEA (51,36 μ L, 0,3 mmol, 3 eq) wurden in 0,5 mL DMF gelöst und für 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das zurückgebliebene gelblich-braune Öl wurde mit TFA/TIS/H₂O, 95/2,5/2,5 (v/v/v), versetzt (**F**), das Rohprodukt mit Diethylether gefällt und über präparative HPLC gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 55 mg, weißes Pulver; t_R : 23,12 min; MS ber. m/z: 643,43, MS gef. m/z: 644,4 (M+H)⁺.

Phac-Arg-Val-Arg-4-(amidomethyl)-N-amidinopiperidin · 3 TFA (**16**)

Verbindung **15** (25 mg, 0,02 mmol, 1 eq) wurde nach Methode (**G**) guanyliert und das Produkt anschließend über präparative HPLC gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 19,5 mg, weißes Pulver; t_R : 24,4 min; MS ber. m/z: 685,45, MS gef. m/z: 343,9 (M+2H)²⁺/2.

Phac-Arg-Val-Arg-4-Amba · 3 TFA (**17**)

Verbindung **2a** (105,2 mg, 0,1 mmol, 1 eq), Verbindung **1** (22,21 mg, 0,1 mmol, 1 eq), PyBOP (57,3 mg, 0,11 mmol, 1,1 eq), 6-Cl-HOBt (20,9 mg, 0,3 mmol, 3 eq) und DIPEA (51,36 μ L, 0,3 mmol, 3 eq) wurden in 0,5 mL DMF gelöst und für 2 h bei RT gerührt. Nach vollständiger Kopplung (HPLC-Kontrolle) wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das erhaltene gelblich-braune Öl wurde mit TFA/TIS/H₂O, 95/2,5/2,5 (v/v/v) entschützt (**F**) und das Produkt über präparative HPLC gereinigt und anschließend lyophilisiert.

Ausbeute: 70 mg, weißes Pulver; t_R : 24,4 min; MS ber. m/z: 678,41, MS gef. m/z: 679,4 (M+H)⁺.

Phac-Arg-Val-Arg-4-(amidomethyl)hydroxybenzamidin · 3 TFA (**18**)

Verbindung **2a** (315,69 mg, 0,3 mmol, 1 eq), 4-Cyanobenzylamin (75,9 mg, 0,45 mmol, 1,5 eq), PyBOP (171,73 mg, 0,32 mmol, 1,1 eq), 6-Cl-HOBt (152,61 mg, 0,9 mmol, 3 eq) und DIPEA (205,4 μ L, 1,2 mmol, 4 eq) wurden in 3 mL DMF gelöst und 16 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand im HV getrocknet. Im Anschluss wurde das Rohpeptid mit Hydroxylamin (125,5 mg, 1,8 mmol, 6 eq) und DIPEA (308 μ L, 1,8 mmol, 6 eq) in 3 mL EtOH abs. gelöst, in N₂-Atmosphäre 6 h unter Rückfluss erhitzt und für 16 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und die Schutzgruppen abgespalten (Methode **F**). Das Produkt wurde über präparative HPLC gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 125 mg, weißes Pulver; t_R : 24,5 min; MS ber. m/z: 694,4, MS gef. m/z: 348,22 $(M+2H)^{2+}/2$.

4.4.6 Synthese von P5-Arg-Val-Arg-4-Amba

Ac-Arg-Val-Arg-4-Amba · 3 TFA (**19**)

2Cl-Trt-Cl-Harz (0,1 g) wird mit Fmoc-Arg(Pbf)-OH beladen (**B**). Die darauf folgenden Kopplungen der Fmoc-Aminosäuren und der Essigsäure erfolgten durch automatische SPPS. Anschließend wurde das Intermediat Ac-Arg(Pbf)-Val-Arg(Pbf)-OH nach Methode **D** erhalten und mit 4-Amba nach Methode **E** gekoppelt. Nach Abspaltung sämtlicher Schutzgruppen (**F**) wurde das Produkt über präparative HPLC gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 35 mg, weißes Pulver; t_R : 16,83 min; MS ber. m/z: 602,38, MS gef. m/z: 201,84 $(M+3H)^{3+}/3$.

Synthese der Verbindungen 20–41

Die Synthese von weiteren Inhibitoren mit verschiedenen Acylresten oder Aminen in P5-Position erfolgte nach dem gleichen Schema wie für Verbindung **19**. Für die Kopplung der Acylreste wurden die freien Säuren verwendet bzw. für die Kopplungen basischer Reste die entsprechenden N-Boc-geschützten ungewöhnlichen Aminosäuren. Die Kopplung in P5-Position erfolgte analog zu den Aminosäuren während der automatischen SPPS. Derivate mit N-terminaler Guanidino-Gruppe (**32**, **34**, **36**, **38** und **40**) wurden nach Abspaltung der Schutzgruppen (Methode **F**) noch nach Methode **G** guanyliert. Alle Verbindungen wurden über präparative HPLC gereinigt und lyophilisiert (Analytik siehe Tabelle [4.6 auf der nächsten Seite](#)).

Fmoc-Arg-Val-Arg-4-Amba · 3 TFA (**42**)

2Cl-Trt-Cl-Harz (0,1 g) wurde mit Fmoc-Arg(Pbf)-OH beladen (**B**) und das Peptid mit automatischer Synthese bis zur P4-Position am Harz aufgebaut (**A**). Es folgte die Abspaltung vom Harz unter Erhalt der Schutzgruppen (**D**) und Kopplung von 4-Amba in P1-Position (**E**) gefolgt von der Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen nach Methode **F**. Das Produkt wurde über präparative HPLC gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 24 mg, weißes Pulver; t_R : 36,8 min; MS ber. m/z: 782,43, MS gef. m/z: 261,93 $(M+3H)^{3+}/3$.

Cbz-Arg-Val-Arg-4-Amba · 3 TFA (**43**)

2Cl-Trt-Cl-Harz (0,1 g) wurde mit Fmoc-Arg(Pbf)-OH beladen (**B**) und das Peptid mit automatischer Synthese bis zur P4-Position am Harz aufgebaut (**A**). Anschließend wurde

4 Experimenteller Teil

Tabelle 4.6: Synthese der Verbindungen **20–41**. Die Synthese erfolgte analog zu Verbindung **19**. Im Fall der Verbindungen **32, 34, 36, 38** und **40** wurden die Amine zusätzlich noch nach Methode **G** in das Guanidin überführt. Die Strukturen der Inhibitoren befinden sich in Tabelle [2.2](#) auf Seite 31.

Nr.	...-RVR-4-Amba · 3 TFA	Ausbeute (mg)	HPLC (min)	MS ber.	MS gef.
20	Butanoyl-	33	20,40	630,41	316,26 ^a
21	Hexanoyl-	44	26,29	658,44	330,30 ^a
22	Octanoyl-	38	32,73	686,47	344,29 ^a
23	Decanoyl-	37	38,78	714,50	239,26 ^b
24	Dodecanoyl-	46	44,16	742,53	372,32 ^a
25	Tetradecanoyl-	44	49,40	770,56	386,37 ^a
26	Palmitoyl-	35	54,38	798,60	267,28 ^b
27	Stearoyl-	41	59,66	826,63	276,63 ^b
28	Palmitoleinoyl-	21	54,50	796,58	399,80 ^a
29	Olenoyl-	23	58,20	824,61	412,56 ^a
30	Linoyl-	25	55,10	822,60	413,63 ^a
31	5-Aminopentanoyl-	41	15,70	659,43	330,91 ^a
32	5-Guanidinopentanoyl-	48	17,30	701,46	351,88 ^a
33	6-Aminohexanoyl-	39	16,50	673,45	337,88 ^a
34	6-Guanidinohexanoyl-	49	19,30	715,47	358,88 ^a
35	2-(Aminomethyl)phenylacetyl-	75	19,50	707,43	708,50 ^c
36	2-(Guanidinomethyl)phenylacetyl-	64	21,80	749,46	750,50 ^c
37	3-(Aminomethyl)phenylacetyl-	62	18,46	707,43	354,73 ^a
38	3-(Guanidinomethyl)phenylacetyl-	31	19,41	749,91	750,38 ^c
39	4-(Aminomethyl)phenylacetyl-	25	18,10	707,43	354,89 ^a
40	4-(Guanidinomethyl)phenylacetyl-	36	19,70	749,46	375,91 ^a
41	3,4-Dichlorphenylacetyl-	48	31,72	746,33	374,24 ^a

^a (M+2H)²⁺/2 ^b (M+3H)³⁺/3 ^c (M+H)⁺

die N-terminale Schutzgruppe durch Behandlung mit 20 % Piperidin in DMF für 1×5 und 1×20 min entfernt. Nachfolgend wurde das Harz gründlich mehrmals mit DMF, DCM und erneut DMF gewaschen und mit Cbz-OSu (154,5 mg, 4 eq) und DIPEA (132,7 μ L, 5 eq) in 1,5 mL abs. THF umgesetzt. Das Harz wurde 16 h bei RT geschüttelt. Das Rohpeptid wurde unter Erhalt der Schutzgruppen vom Harz abgespalten (**D**) und mit 4-Amba gekoppelt (**E**). Nach Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen (**F**) wurde das Produkt über präparative HPLC gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 18 mg, weißes Pulver t_R : 27,78 min; MS ber. m/z: 694,4, MS gef. m/z: 232,57 (M+3H)³⁺/3.

Tosyl-Arg-Val-Arg-4-Amba · 3 TFA (**44**)

Die harzgebundene Zwischenstufe H-Arg(Pbf)-Val-Arg(Pbf) wurde analog zu Verbindung **43** aufgebaut. Dann wurde das Harz mit *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (76,26 mg, 0,4 mmol, 2,6 eq) und DIPEA (130 μ L, 0,5 mmol, 3,2 eq) gelöst in 1,5 mL abs. THF versetzt. Die Lösung wurde für 2 h bei RT geschüttelt. Nach Waschen des Harzes wurde das Rohpeptid unter Erhalt der Schutzgruppen vom Harz abgespalten (**D**) und mit 4-Amba gekoppelt (**E**). Nach Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen (**F**) wurde das Produkt über präparative HPLC gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 35 mg, weißes Pulver; t_R : 27,02 min; MS ber. m/z : 714,37, MS gef. m/z : 358,25 ($M+2H$)²⁺/2.

H-Arg-Val-Arg-4-Amba · 3 TFA (**45**)

Verbindung **42** (10 mg, 8,88 μ M, 1 eq) wurde mit einer 20%igen Lösung aus Piperidin in DMF versetzt und 1 h bei RT gerührt. Das Produkt wurde vom Lösungsmittel *in vacuo* befreit und über präparative HPLC gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 5 mg, weißes Pulver; t_R : 15,12 min; MS ber. m/z : 560,37, MS gef. m/z : 561,3 ($M+H$)⁺.

4.4.7 Synthese von Phac-Arg-P3-Arg-4-Amba

Zusätzlich zu Verbindung **17** (Phac-Arg-Val-Arg-4-Amba) wurden in der P3-Position alle anderen 19 proteinogenen L-Aminosäuren und für Verbindung **65** 2,3-Diaminopropionsäure eingebaut. Die Synthese verlief analog zu Verbindung **19** (auf Seite 93); für die Kopplung der P5-Position wurde Phenylelessigsäure eingesetzt. Eine Übersicht mit den entsprechenden analytischen Daten befindet sich in Tabelle 4.7 auf der nächsten Seite.

4.4.8 Lysin- und *homo*-Arginin-Derivate

Phac-Arg-Val-Lys(Cbz)-4-(amido)butylamin · 2 TFA (**66**)

Trt-Cl-Harz (0,4 g) wurde mit 1,4-Diaminobutan (240,4 μ L, 2,4 mmol, 4 eq) beladen (**C**). Die folgenden Reste wurden analog der Synthese von **7** unter Verwendung von Fmoc-Lys(Cbz)-OH als P2-Rest gekoppelt. Der Cbz-geschützte Inhibitor wurde dann nach Methode **F** vom Harz abgespalten, allerdings wurde die Abspaltzeit in diesem Fall auf 1 h verkürzt. Das Produkt wurde über präparative HPLC gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 162 mg, weißes Pulver; t_R : 36,1 min; MS ber. m/z : 723,44, MS gef. m/z : 724,62 ($M+H$)⁺.

4 Experimenteller Teil

Tabelle 4.7: Analytische Daten der Inhibitoren mit der allgemeinen Formel Phac-Arg-P3-Arg-4-Amba · 3 TFA.

Nr.	P3	Ausbeute (mg)	HPLC (min)	MS ber.	MS gef.
46	Glycin	29	21,40	636,36	319,3 ^a
47	Alanin	40	21,80	650,38	326,4 ^a
48	Leucin	40	27,50	692,42	347,3 ^a
49	Isoleucin	42	27,10	692,42	347,3 ^a
50	Methionin	28	25,86	710,89	711,5 ^b
51	Phenylalanin	20	29,90	726,41	364,3 ^a
52	Prolin	40	22,77	676,39	226,5 ^c
53	Tyrosin	40	24,96	742,40	743,4 ^b
54	Tryptophan	33	29,25	765,42	766,6 ^b
55	Serin	34	20,70	666,37	334,3 ^a
56	Threonin	40	21,40	680,39	341,3 ^a
57	Cystein	18	23,46	682,35	683,4 ^b
58	Lysin	18	19,90	707,43	354,8 ^a
59	Arginin	47	21,50	735,44	368,8 ^a
60	Histidin	16	20,20	716,40	359,3 ^a
61	Asparaginsäure	24	21,00	694,37	348,3 ^a
62	Glutaminsäure	33	22,16	708,38	709,4 ^b
63	Asparagin	24	20,60	693,38	347,9 ^a
64	Glutamin	37	20,93	707,40	708,4 ^b
65	2,3-Diaminopropionsäure ^d	60	19,87	665,39	666,2 ^b

^a (M+2H)²⁺/2 ^b (M+H)⁺ ^c (M+3H)³⁺/3 ^d Für die Synthese wurde Fmoc-Dap(Boc)-OH eingesetzt

Phac-Arg-Val-Lys-4-(amido)butylamin · 3 TFA (**67**)

Verbindung **66** (30 mg, 0,032 mmol, 1 eq) wurde mit 3 mg Pd/C (10 %) in 30 mL 90%iger Essigsäure versetzt und 16 h unter H₂-Atmosphäre hydriert. Dann wurde der Katalysator abfiltriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das Produkt über präparative HPLC gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 23 mg, weißes Pulver; *t_R*: 21,8 min; MS ber. m/z: 589,41, MS gef. m/z: 590,41 (M+H)⁺.

Phac-Arg-Val-Lys(Cbz)-Agmatin · 2 TFA (**68**)

Verbindung **66** (102 mg, 0,11 mmol, 1 eq) wurde nach Methode **G** guanyliert und das Produkt über präparative HPLC gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 90 mg, weißes Pulver; *t_R*: 36,8 min; MS ber. m/z: 765,46, MS gef. m/z: 766,47 (M+H)⁺.

Phac-Arg-Val-Lys-Agmatin · 3 TFA (**69**)

Verbindung **68** (50 mg, 0,05 mmol, 1 eq) wurde mit 50 mg Pd/C (10 % w/w) in 50 mL 90%iger Essigsäure versetzt und 16 h unter H₂-Atmosphäre hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert, das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das Produkt über präparative HPLC gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 51 mg, weißes Pulver t_R : 25,1 min; MS ber. m/z: 631,43, MS gef. m/z: 316,75 (M+2H)²⁺/2.

Phac-Arg-Val-hArg-Agmatin · 3 TFA (**70**)

Verbindung **69** (20 mg, 0,02 mmol, 1 eq) wurde nach Methode **G** guanyliert und das Produkt über präparative HPLC gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 15 mg, weißes Pulver; t_R : 24,3 min; MS ber. m/z: 673,45, MS gef. m/z: 674,4 (M+H)⁺.

Synthese der Verbindungen 71–76

Die Synthese weiterer Lysin-Derivate verlief analog der Synthesestrategie für Verbindung **19**. Dabei wurde für die Kopplung von Lysin Fmoc-Lys(Cbz)-OH verwendet. Nach Abspaltung vom Harz unter Erhalt der Schutzgruppen (**D**), 4-Amba-Kopplung (**E**) und Abspaltung der säurelabilen Schutzgruppen (unter verkürzter Reaktionsdauer von 1 h, **F**) wurden die erhaltenen Rohpeptide zur Abspaltung der Cbz-Gruppen entsprechend der Synthese für Inhibitor **69** hydriert (außer für Verbindung **73**), um das Endprodukt zu erhalten. Eine Zusammenfassung der so synthetisierten Peptide befindet sich in Tabelle 4.8.

Tabelle 4.8: Synthese der Lysin-Derivate **71–76**. Die Strukturen dieser Verbindungen sind in Tabelle 2.3 auf Seite 47 gezeigt.

Nr.	Verbindung	Ausbeute (mg)	HPLC (min)	MS ber.	MS gef.
71	Phac-Arg-Val-Lys-4-Amba · 3 TFA	48	24,0	650,40	326,22 ^a
72	Phac-Lys-Val-Arg-4-Amba · 3 TFA	5	27,0	650,40	326,30 ^a
73	Phac-Lys(Z)-Val-Arg-4-Amba · 2 TFA	39	39,5	784,44	393,26 ^a
74	Dec-Arg-Val-Lys-4-Amba · 3 TFA ^b	42	38,1	686,50	344,29 ^a
75	Phac-Arg-Dap-Lys-4-Amba · 4 TFA ^c	49	19,1	637,38	638,25 ^d

^a (M+2H)²⁺/2 ^b In P5-Position wurde Decansäure statt Phenyllessigsäure gekoppelt

^c In P3-Position wurde Fmoc-Dap(Boc)-OH gekoppelt ^d (M+H)⁺

4.4.9 Synthese von Verbindungen mit D-Arginin

Phac-dArg-Arg-4-Amba · 3 TFA (**76**)

Die Synthese verlief analog zu Verbindung **19** unter Verwendung von Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH für den Einbau des P3-Restes bzw. von Phenylelessigsäure für die P4-Position. Das Produkt wurde über präparative HPLC gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 44 mg, weißes Pulver; t_R : 21,33 min; MS ber. m/z: 579,34, MS gef. m/z: 290,49 $(M+2H)^{2+}/2$.

Phac-Val-dArg-Arg-4-Amba · 3 TFA (**77**)

Die Synthese erfolgte analog zu Verbindung **19** unter Verwendung von Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH für den Einbau des P3-Restes bzw. von Phenylelessigsäure für die P5-Position. Das Produkt wurde über präparative HPLC gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 43 mg, weißes Pulver; t_R : 26,0 min; MS ber. m/z: 678,41, MS gef. m/z: 227,24 $(M+3H)^{3+}/3$.

Phac-dArg-Val-Arg-4-Amba · 3 TFA (**78**)

Die Synthese erfolgte analog zu Verbindung **19** unter Verwendung von Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH für den Einbau des P4-Restes bzw. von Phenylelessigsäure für die P5-Position. Das Produkt wurde über präparative HPLC gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 44 mg, weißes Pulver; t_R : 22,9 min; MS ber. m/z: 678,41, MS gef. m/z: 340,33 $(M+2H)^{2+}/2$.

4.4.10 Biotinylierte Verbindungen

Die Strukturen der Verbindungen **79–81** sind im Ergebnisteil in Tabelle [2.6 auf Seite 71](#) aufgeführt.

Biotinyl-Ado-Val-Arg-4-Amba · 2 TFA (**79**)

Zunächst wurde 2Cl-Trt-Cl-Harz (1 g, 1,55 mmol) mit Fmoc-Arg(Pbf)-OH beladen (**B**). Es folgte manuelle SPPS (**A**) mit der Kopplung Fmoc-Val-OH und von 1 eq Fmoc-Ado-OH (Ado: 8-(Amino)-3,6-dioxa-octansäure, 597,4 mg, 1,55 mmol, 1 eq) mit HOBt/HBTU/DIPEA 1:1:2 gefolgt von der Biotylierung unter Verwendung eines 2-fachen Überschusses von Biotin (757,4 mg, 3,1 mmol, 2 eq) mit HOBt/HBTU/DIPEA 2:2:4 in 10 mL DMSO/DMF 1:1. Nach der Biotinylierung wurde das Harz gründlich gewaschen (DMF, DCM, DMF, DCM). Das Rohprodukt wurde vom Harz abgespalten (**D**) und im Anschluss mit 4-Amba gekoppelt (**E**). Darauf folgend wurden die Schutzgruppen abgespalten

(F) und das Produkt über präparative HPLC gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 424 mg, weißes Pulver; t_R : 24,62 min; MS ber. m/z: 775,42, MS gef. m/z: 776,5 (M+H)⁺.

Biotinyl-Ado-Arg-Pro-Arg-4-Amba · 3 TFA (**80**)

Nach Beladung von 2Cl-Trt-Cl-Harz (0,1 g, 0,155 mmol) mit Fmoc-Arg(Pbf)-OH (**B**) folgte manuelle SPPS (**A**) mit der Kopplung Fmoc-Val-OH und Fmoc-Arg(Pbf)-OH (**A**). Die Kopplung von Ado bzw. Biotin erfolgte analog zu Verbindung **79**. Das Rohprodukt wurde vom Harz abgespalten (**D**) und im Anschluss mit 4-Amba gekoppelt (**E**). Darauf folgend wurden die Schutzgruppen abgespalten (**F**) und das Produkt über präparative HPLC gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 72 mg, weißes Pulver; t_R : 21,36 min; MS ber. m/z: 929,5, MS gef. m/z: 930,6 (M+H)⁺.

Biotinyl-Ado-Ado-Arg-Pro-Arg-4-Amba · 3 TFA (**81**)

Es wurde 2Cl-Trt-Cl-Harz (0,25 g, 0,388 mmol) mit Fmoc-Arg(Pbf)-OH beladen (**B**). Die Synthese verlief analog zu Verbindung **80** mit dem Unterschied, dass Fmoc-(Ado)₂-OH an das harzgebundene Peptid gekoppelt wurde. Das Produkt wurde über präparative HPLC gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 148 mg, weißes Pulver; t_R : 22,82 min; MS ber. m/z: 1074,58, MS gef. m/z: 1075,51 (M+H)⁺.

4.4.11 Sonstige Inhibitoren

Ac-Val-Arg-4-Amba · 2 TFA (**82**)

Die Synthese von Verbindung **82** verlief analog zu Verbindung **19** (auf Seite 93), außer dass auf die zweite Kopplung von Arginin als P4-Rest verzichtet wurde. Das Produkt wurde über präparative HPLC gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 32 mg, weißes Pulver; t_R : 18,58 min; MS ber. m/z: 446,28, MS gef. m/z: 447,34 (M+H)⁺.

Phac-Arg-Val-(N-methyl)Arg-4-Amba · 3 TFA (**83**)

Zunächst wurde 2Cl-Trt-Cl-Harz (0,15 g, 0,23 mmol) mit Fmoc-(N-Methyl)Arg(Mtr)-OH beladen (**B**). Anschließend wurde Fmoc-Val-OH mittels manueller SPPS (**A**) unter Verwendung eines 6-fachen Überschusses des Aminosäurederivats und HOBt/HBTU/DIPEA 6:6:12 an das H-(N-Methyl)Arg(Mtr)-Harz gekoppelt. Die weiteren Kopplungsschritte verliefen analog zu Methode A. Das Rohprodukt wurde vom Harz abgespalten (**D**) und im

4 Experimenteller Teil

Anschluss mit 4-Amba gekoppelt (**E**). Darauf folgend wurden die Schutzgruppen abgespalten (**F**) und das Produkt über präparative HPLC gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 10 mg, weißes Pulver; t_R : 30,43 min; MS ber. m/z : 692,42, MS gef. m/z : 347,35 ($M+2H$)²⁺.

Phac-Cit-Val-Arg-4-Amba · 2 TFA (**84**)

Die Synthese von Verbindung **82** verlief analog zu Verbindung **19** (auf Seite 93), außer dass für die Kopplung in P4-Position Fmoc-Cit-OH eingesetzt wurde. Das Produkt wurde über präparative HPLC gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 56 mg, weißes Pulver; t_R : 25,93 min; MS ber. m/z : 679,39, MS gef. m/z : 680,52 ($M+H$)⁺.

4.4.12 Synthese der AMC-Substrate

Ac-Arg-Val-Arg-Arg-AMC · 3 TFA (**85**)

Verbindung **2b** (97,6 mg, 0,1 mmol, 1 eq) wurde in 1 mL DMF mit H-Arg-AMC · 2 HCl (40,4 mg, 0,1 mmol, 1 eq), PyBOP (57,3 mg, 0,11 mmol, 1, eq) und 6Cl-HOBt (50,9 mg, 0,3 mmol, 3 eq) gelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von DIPEA (35 μ L, 0,2 mmol, 2 eq) gestartet und bei RT über Nacht gerührt. Die Reaktionskontrolle (HPLC) nach 18 h zeigte noch peptidisches Edukt zu 40 % im Ansatz. Es erfolgte erneut eine Zugabe von 0,45 eq PyBOP und 0,8 eq DIPEA. Nach 48 h Rühren wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und die Schutzgruppen abgespalten (Methode **F**). Das Produkt wurde über präparative HPLC gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 36 mg, weißes Pulver; t_R : 24,9 min; MS ber. m/z : 784,45, MS gef. m/z : 262,47 ($M+3H$)³⁺.

Phac-Arg-Val-Arg-Arg-AMC · 3 TFA (**86**)

Verbindung **2a** (105,2 mg, 0,1 mmol, 1 eq) wurde in 1 mL DMF mit H-Arg-AMC · 2 HCl (40,4 mg, 0,1 mmol, 1 eq), PyBOP (57,3 mg, 0,11 mmol, 1, eq) und 6Cl-HOBt (50,9 mg, 0,3 mmol, 3 eq) gelöst. Die Reaktion verlief analog zu Verbindung **85**.

Ausbeute: 53 mg, weißes Pulver; t_R : 30,5 min; MS ber. m/z : 860,48, MS gef. m/z : 287,82 ($M+3H$)³⁺.

5 Literaturverzeichnis

- [1] Buda, S.; Köpke, K.; Luchtenberg, M.; Schweiger, B.; Biere, B.; Duwe, S.; Fiebig, L.; Buchholz, U.; an der Heiden, M. & Haas, W., Bericht zur Epidemiologie der Influenza in Deutschland, Saison 2009/10. Bericht, Robert Koch-Institut, Nordufer 20, 13353 Berlin, **2010**.
- [2] Johnson, N. P. A. S. & Mueller, J., Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 „Spanish“ influenza pandemic. *Bull Hist Med* **2002**, 76, 105–115.
- [3] Taubenberger, J. K. & Morens, D. M., Influenza: the once and future pandemic. *Public Health Rep* **2010**, 125 Suppl 3, 16–26.
- [4] Matrosovich, M.; Stech, J. & Klenk, H. D., Influenza receptors, polymerase and host range. *Rev Sci Tech* **2009**, 28, 203–217.
- [5] Zambon, M. C., Epidemiology and pathogenesis of influenza. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **1999**, 44, 3–9.
- [6] Joosting, A. C.; Head, B.; Bynoe, M. L. & Tyrrell, D. A., Production of common colds in human volunteers by influenza C virus. *Br Med J* **1968**, 4, 153–154.
- [7] Hatta, M. & Kawaoka, Y., The continued pandemic threat posed by avian influenza viruses in Hong Kong. *Trends Microbiol* **2002**, 10, 340–344.
- [8] Schäfer, W., Vergleichende sero-immunologische Untersuchungen über die Viren der Influenza und klassischen Geflügelpest. *Z Naturf* **1955**, 10b, 81–91.
- [9] Michaelis, M.; Doerr, H. W. & Cinatl, J., Of chickens and men: avian influenza in humans. *Curr Mol Med* **2009**, 9, 131–151.
- [10] Wu, G. & Yan, S.-M., Mutation trend of hemagglutinin of influenza A virus: a review from a computational mutation viewpoint. *Acta Pharmacol Sin* **2006**, 27, 513–526.
- [11] Reece, P. A., Neuraminidase inhibitor resistance in influenza viruses. *J Med Virol* **2007**, 79, 1577–1586.

- [12] Meijer, A.; Lackenby, A.; Hungnes, O.; Lina, B.; van-der Werf, S.; Schweiger, B.; Opp, M.; Paget, J.; van-de Kasstele, J.; Hay, A.; Zambon, M. & Scheme, E. I. S., Oseltamivir-resistant influenza virus A (H1N1), Europe, 2007-08 season. *Emerg Infect Dis* **2009**, *15*, 552–560.
- [13] Dharan, N. J.; Gubareva, L. V.; Meyer, J. J.; Okomo-Adhiambo, M.; McClinton, R. C.; Marshall, S. A.; George, K. S.; Epperson, S.; Brammer, L.; Klimov, A. I.; Bresee, J. S.; Fry, A. M. & Group, O.-R. W., Infections with oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) virus in the United States. *JAMA* **2009**, *301*, 1034–1041.
- [14] Hurt, A. C.; Ernest, J.; Deng, Y.-M.; Iannello, P.; Besselaar, T. G.; Birch, C.; Buchy, P.; Chittaganpitch, M.; Chiu, S.-C.; Dwyer, D.; Guigon, A.; Harrower, B.; Kei, I. P.; Kok, T.; Lin, C.; McPhie, K.; Mohd, A.; Olveda, R.; Panayotou, T.; Rawlinson, W.; Scott, L.; Smith, D.; D'Souza, H.; Komadina, N.; Shaw, R.; Kelso, A. & Barr, I. G., Emergence and spread of oseltamivir-resistant A(H1N1) influenza viruses in Oceania, South East Asia and South Africa. *Antiviral Res* **2009**, *83*, 90–93.
- [15] Moscona, A., Global transmission of oseltamivir-resistant influenza. *N Engl J Med* **2009**, *360*, 953–956.
- [16] Deyde, V. M.; Sheu, T. G.; Trujillo, A. A.; Okomo-Adhiambo, M.; Garten, R.; Klimov, A. I. & Gubareva, L. V., Detection of molecular markers of drug resistance in 2009 pandemic influenza A (H1N1) viruses by pyrosequencing. *Antimicrob Agents Chemother* **2010**, *54*, 1102–1110.
- [17] Boltz, D. A.; Aldridge, J. R.; Webster, R. G. & Govorkova, E. A., Drugs in development for influenza. *Drugs* **2010**, *70*, 1349–1362.
- [18] Gamblin, S. J. & Skehel, J. J., Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. *J Biol Chem* **2010**, *285*, 28403–28409.
- [19] Steinmetzer, T., Strategien für die Entwicklung neuartiger Grippemittel. *Pharm Unserer Zeit* **2011**, *40*, in Druck.
- [20] Marjuki, H.; Gornitzky, A.; Marathe, B. M.; Ilyushina, N. A.; Aldridge, J. R.; Desai, G.; Webby, R. J. & Webster, R. G., Influenza A Virus-Induced Early Activation of ERK and PI3K Mediates V-ATPase-Dependent Intracellular pH Change Required for Fusion. *Cell Microbiol* **2010**.

- [21] Hughson, F. M., Enveloped viruses: a common mode of membrane fusion?. *Curr Biol* **1997**, 7, R565–R569.
- [22] Matsubara, T.; Onishi, A.; Saito, T.; Shimada, A.; Inoue, H.; Taki, T.; Nagata, K.; Okahata, Y. & Sato, T., Sialic acid-mimic peptides as hemagglutinin inhibitors for anti-influenza therapy. *J Med Chem* **2010**, 53, 4441–4449.
- [23] Dröse, S. & Altendorf, K., Bafilomycins and concanamycins as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases. *J Exp Biol* **1997**, 200, 1–8.
- [24] Gong, J.; Fang, H.; Li, M.; Liu, Y.; Yang, K.; Liu, Y. & Xu, W., Potential targets and their relevant inhibitors in anti-influenza fields. *Curr Med Chem* **2009**, 16, 3716–3739.
- [25] Bizebard, T.; Gigant, B.; Rigolet, P.; Rasmussen, B.; Diat, O.; Bösecke, P.; Wharton, S. A.; Skehel, J. J. & Knossow, M., Structure of influenza virus haemagglutinin complexed with a neutralizing antibody. *Nature* **1995**, 376, 92–94.
- [26] Garten, W. & Klenk, H. D., Understanding influenza virus pathogenicity. *Trends Microbiol* **1999**, 7, 99–100.
- [27] Skehel, J. J. & Wiley, D. C., Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* **2000**, 69, 531–569.
- [28] Vey, M.; Orlich, M.; Adler, S.; Klenk, H. D.; Rott, R. & Garten, W., Hemagglutinin activation of pathogenic avian influenza viruses of serotype H7 requires the protease recognition motif R-X-K/R-R. *Virology* **1992**, 188, 408–413.
- [29] Garten, W.; Vey, M.; Stieneke-Gröber, A.; Schäfer, W.; Angliker, H.; Shaw, E. & Klenk, H. D., The activating enzyme of the FPV hemagglutinin is furin, a subtilisin-like eukaryotic endoprotease. In *Options for the control of influenza II*, C. Hannoun, Herausgeber, International Conference on Options for the Control of Influenza, Excerpta Media, Amsterdam, New York, International congress series 1019, 311–322.
- [30] Horimoto, T. & Kawaoka, Y., Reverse genetics provides direct evidence for a correlation of hemagglutinin cleavability and virulence of an avian influenza A virus. *J Virol* **1994**, 68, 3120–3128.
- [31] Horimoto, T. & Kawaoka, Y., Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. *Clin Microbiol Rev* **2001**, 14, 129–149.

- [32] Böttcher-Friebertshäuser, E.; Freuer, C.; Sielaff, F.; Schmidt, S.; Eickmann, M.; Uhlenendorff, J.; Steinmetzer, T.; Klenk, H.-D. & Garten, W., Cleavage of influenza virus hemagglutinin by airway proteases TMPRSS2 and HAT differs in subcellular localization and susceptibility to protease inhibitors. *J Virol* **2010**, *84*, 5605–5614.
- [33] Chaipan, C.; Kobasa, D.; Bertram, S.; Glowacka, I.; Steffen, I.; Tsegaye, T. S.; Takeda, M.; Bugge, T. H.; Kim, S.; Park, Y.; Marzi, A. & Pöhlmann, S., Proteolytic activation of the 1918 influenza virus hemagglutinin. *J Virol* **2009**, *83*, 3200–3211.
- [34] Garten, W. & Klenk, H. D., Cleavage activation of the influenza virus hemagglutinin and its role in pathogenesis. In *Avian Influenza*, Band 27, H. D. Klenk; M. Matrosovich & J. Stech, Herausgeber, Karger, Basel, Schweiz, **2008**, 156–167.
- [35] Stein, L. D., Human genome: end of the beginning. *Nature* **2004**, *431*, 915–916.
- [36] Rawlings, N. D. & Barrett, A. J., MEROPS, The peptidase database. <http://merops.sanger.ac.uk/index.shtml>.
- [37] Turk, B., Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov* **2006**, *5*, 785–799.
- [38] Seidah, N. G.; Mayer, G.; Zaid, A.; Rousselet, E.; Nassoury, N.; Poirier, S.; Essalmani, R. & Prat, A., The activation and physiological functions of the proprotein convertases. *Int J Biochem Cell Biol* **2008**, *40*, 1111–1125.
- [39] Fugère, M. & Day, R., Cutting back on pro-protein convertases: the latest approaches to pharmacological inhibition. *Trends Pharmacol Sci* **2005**, *26*, 294–301.
- [40] Rockwell, N. C. & Thorner, J. W., The kindest cuts of all: crystal structures of Kex2 and furin reveal secrets of precursor processing. *Trends Biochem Sci* **2004**, *29*, 80–87.
- [41] Thomas, G., Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2002**, *3*, 753–766.
- [42] Sun, X.; Essalmani, R.; Seidah, N. G. & Prat, A., The proprotein convertase PC5/6 is protective against intestinal tumorigenesis: in vivo mouse model. *Mol Cancer* **2009**, *8*, 73.
- [43] Creemers, J. W. M. & Khatib, A.-M., Knock-out mouse models of proprotein convertases: unique functions or redundancy? *Front Biosci* **2008**, *13*, 4960–4971.

- [44] Roebroek, A. J. M.; Taylor, N. A.; Louagie, E.; Pauli, I.; Smeijers, L.; Snellinx, A.; Lauwers, A.; de Ven, W. J. M. V.; Hartmann, D. & Creemers, J. W. M., Limited redundancy of the proprotein convertase furin in mouse liver. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 53442–53450.
- [45] Zhou, A.; Martin, S.; Lipkind, G.; LaMendola, J. & Steiner, D. F., Regulatory roles of the P domain of the subtilisin-like prohormone convertases. *J Biol Chem* **1998**, *273*, 11107–11114.
- [46] Henrich, S.; Cameron, A.; Bourenkov, G. P.; Kiefersauer, R.; Huber, R.; Lindberg, I.; Bode, W. & Than, M. E., The crystal structure of the proprotein processing proteinase furin explains its stringent specificity. *Nat Struct Biol* **2003**, *10*, 520–526.
- [47] Lusson, J.; Benjannet, S.; Hamelin, J.; Savaria, D.; Chrétien, M. & Seidah, N. G., The integrity of the RRGDL sequence of the proprotein convertase PC1 is critical for its zymogen and C-terminal processing and for its cellular trafficking. *Biochem J* **1997**, *326* (Pt 3), 737–744.
- [48] Rovère, C.; Luis, J.; Lissitzky, J. C.; Basak, A.; Marvaldi, J.; Chrétien, M. & Seidah, N. G., The RGD motif and the C-terminal segment of proprotein convertase 1 are critical for its cellular trafficking but not for its intracellular binding to integrin alpha5beta1. *J Biol Chem* **1999**, *274*, 12461–12467.
- [49] Creemers, J. W.; Vey, M.; Schäfer, W.; Ayoubi, T. A.; Roebroek, A. J.; Klenk, H. D.; Garten, W. & de Ven, W. J. V., Endoproteolytic cleavage of its propeptide is a prerequisite for efficient transport of furin out of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **1995**, *270*, 2695–2702.
- [50] Roebroek, A. J.; Schalken, J. A.; Leunissen, J. A.; Onnekink, C.; Bloemers, H. P. & de Ven, W. J. V., Evolutionary conserved close linkage of the c-fes/fps proto-oncogene and genetic sequences encoding a receptor-like protein. *EMBO J* **1986**, *5*, 2197–2202.
- [51] Fuller, R. S.; Brake, A. J. & Thorner, J., Intracellular targeting and structural conservation of a prohormone-processing endoprotease. *Science* **1989**, *246*, 482–486.
- [52] van de Ven, W. J.; Voorberg, J.; Fontijn, R.; Pannekoek, H.; van den Ouweland, A. M.; van Duijnhoven, H. L.; Roebroek, A. J. & Siezen, R. J., Furin is a subtilisin-like proprotein processing enzyme in higher eukaryotes. *Mol Biol Rep* **1990**, *14*, 265–275.

5 Literaturverzeichnis

- [53] Seidah, N. G.; Day, R.; Marcinkiewicz, M. & Chrétien, M., Precursor convertases: an evolutionary ancient, cell-specific, combinatorial mechanism yielding diverse bioactive peptides and proteins. *Ann N Y Acad Sci* **1998**, 839, 9–24.
- [54] Thacker, C. & Rose, A. M., A look at the *Caenorhabditis elegans* Kex2/Subtilisin-like proprotein convertase family. *Bioessays* **2000**, 22, 545–553.
- [55] Anderson, E. D.; Molloy, S. S.; Jean, F.; Fei, H.; Shimamura, S. & Thomas, G., The ordered and compartment-specific autoproteolytic removal of the furin intramolecular chaperone is required for enzyme activation. *J Biol Chem* **2002**, 277, 12879–12890.
- [56] Molloy, S. S.; Anderson, E. D.; Jean, F. & Thomas, G., Bi-cycling the furin pathway: from TGN localization to pathogen activation and embryogenesis. *Trends Cell Biol* **1999**, 9, 28–35.
- [57] Wan, L.; Molloy, S. S.; Thomas, L.; Liu, G.; Xiang, Y.; Rybak, S. L. & Thomas, G., PACS-1 defines a novel gene family of cytosolic sorting proteins required for trans-Golgi network localization. *Cell* **1998**, 94, 205–216.
- [58] Remacle, A. G.; Shiryaev, S. A.; Oh, E.-S.; Cieplak, P.; Srinivasan, A.; Wei, G.; Liddington, R. C.; Ratnikov, B. I.; Parent, A.; Desjardins, R.; Day, R.; Smith, J. W.; Lebl, M. & Strongin, A. Y., Substrate cleavage analysis of furin and related proprotein convertases. A comparative study. *J Biol Chem* **2008**, 283, 20897–20906.
- [59] Izidoro, M. A.; Gouvea, I. E.; Santos, J. A. N.; Assis, D. M.; Oliveira, V.; Judice, W. A. S.; Juliano, M. A.; Lindberg, I. & Juliano, L., A study of human furin specificity using synthetic peptides derived from natural substrates, and effects of potassium ions. *Arch Biochem Biophys* **2009**, 487, 105–114.
- [60] Roebroek, A. J.; Umans, L.; Pauli, I. G.; Robertson, E. J.; van Leuven, F.; de Ven, W. J. V. & Constam, D. B., Failure of ventral closure and axial rotation in embryos lacking the proprotein convertase Furin. *Development* **1998**, 125, 4863–4876.
- [61] Dubois, C. M.; Blanchette, F.; Laprise, M. H.; Leduc, R.; Grondin, F. & Seidah, N. G., Evidence that furin is an authentic transforming growth factor-beta1-converting enzyme. *Am J Pathol* **2001**, 158, 305–316.

- [62] Cui, Y.; Jean, F.; Thomas, G. & Christian, J. L., BMP-4 is proteolytically activated by furin and/or PC6 during vertebrate embryonic development. *EMBO J* **1998**, *17*, 4735–4743.
- [63] Cross, J. C.; Simmons, D. G. & Watson, E. D., Chorioallantoic morphogenesis and formation of the placental villous tree. *Ann N Y Acad Sci* **2003**, *995*, 84–93.
- [64] Elices, M. J.; Osborn, L.; Takada, Y.; Crouse, C.; Luhowskyj, S.; Hemler, M. E. & Lobb, R. R., VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* **1990**, *60*, 577–584.
- [65] Bergeron, E.; Basak, A.; Decroly, E. & Seidah, N. G., Processing of alpha4 integrin by the proprotein convertases: histidine at position P6 regulates cleavage. *Biochem J* **2003**, *373*, 475–484.
- [66] Mumm, J. S.; Schroeter, E. H.; Saxena, M. T.; Griesemer, A.; Tian, X.; Pan, D. J.; Ray, W. J. & Kopan, R., A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Mol Cell* **2000**, *5*, 197–206.
- [67] Schneider, P.; Street, S. L.; Gaide, O.; Hertig, S.; Tardivel, A.; Tschopp, J.; Runkel, L.; Alevizopoulos, K.; Ferguson, B. M. & Zonana, J., Mutations leading to X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia affect three major functional domains in the tumor necrosis factor family member ectodysplasin-A. *J Biol Chem* **2001**, *276*, 18819–18827.
- [68] Bassi, D. E.; Cicco, R. L. D.; Mahloogi, H.; Zucker, S.; Thomas, G. & Klein-Szanto, A. J., Furin inhibition results in absent or decreased invasiveness and tumorigenicity of human cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, *98*, 10326–10331.
- [69] Scamuffa, N.; Siegfried, G.; Bontemps, Y.; Ma, L.; Basak, A.; Cherel, G.; Calvo, F.; Seidah, N. G. & Khatib, A.-M., Selective inhibition of proprotein convertases represses the metastatic potential of human colorectal tumor cells. *J Clin Invest* **2008**, *118*, 352–363.
- [70] Khatib, A.-M.; Bassi, D.; Siegfried, G.; Klein-Szanto, A. J. P. & Ouafik, L., Endo/exo-proteolysis in neoplastic progression and metastasis. *J Mol Med* **2005**, *83*, 856–864.

- [71] Bassi, D. E.; Fu, J.; de Cicco, R. L. & Klein-Szanto, A. J. P., Proprotein convertases: master switches in the regulation of tumor growth and progression. *Mol Carcinog* **2005**, *44*, 151–161.
- [72] Müller, E. J.; Caldelari, R. & Posthaus, H., Role of subtilisin-like convertases in cadherin processing or the conundrum to stall cadherin function by convertase inhibitors in cancer therapy. *J Mol Histol* **2004**, *35*, 263–275.
- [73] Bennett, B. D.; Denis, P.; Haniu, M.; Teplow, D. B.; Kahn, S.; Louis, J. C.; Citron, M. & Vassar, R., A furin-like convertase mediates propeptide cleavage of BACE, the Alzheimer's beta -secretase. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 37712–37717.
- [74] Stawowy, P.; Meyborg, H.; Stibenz, D.; Stawowy, N. B. P.; Roser, M.; Thanabalasingam, U.; Veinot, J. P.; Chrétien, M.; Seidah, N. G.; Fleck, E. & Graf, K., Furin-like proprotein convertases are central regulators of the membrane type matrix metalloproteinase-pro-matrix metalloproteinase-2 proteolytic cascade in atherosclerosis. *Circulation* **2005**, *111*, 2820–2827.
- [75] Hallenberger, S.; Bosch, V.; Angliker, H.; Shaw, E.; Klenk, H. D. & Garten, W., Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature* **1992**, *360*, 358–361.
- [76] Jean, F.; Stella, K.; Thomas, L.; Liu, G.; Xiang, Y.; Reason, A. J. & Thomas, G., alpha1-Antitrypsin Portland, a bioengineered serpin highly selective for furin: application as an antipathogenic agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, *95*, 7293–7298.
- [77] Liu, Z.; Fei, H. & Chi, C., Two engineered eglin c mutants potently and selectively inhibiting kexin or furin. *FEBS Lett* **2004**, *556*, 116–120.
- [78] Lu, W.; Zhang, W.; Molloy, S. S.; Thomas, G.; Ryan, K.; Chiang, Y.; Anderson, S. & Laskowski, M., Arg15-Lys17-Arg18 turkey ovomucoid third domain inhibits human furin. *J Biol Chem* **1993**, *268*, 14583–14585.
- [79] Basak, A.; Chen, A.; Scamuffa, N.; Mohottalage, D.; Basak, S. & Khatib, A.-M., Blockade of furin activity and furin-induced tumor cells malignant phenotypes by the chemically synthesized human furin prodomain. *Curr Med Chem* **2010**, *17*, 2214–2221.
- [80] Cameron, A.; Appel, J.; Houghten, R. A. & Lindberg, I., Polyarginines are potent furin inhibitors. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 36741–36749.

- [81] Kacprzak, M. M.; Peinado, J. R.; Than, M. E.; Appel, J.; Henrich, S.; Lipkind, G.; Houghten, R. A.; Bode, W. & Lindberg, I., Inhibition of furin by polyarginine-containing peptides: nanomolar inhibition by nona-D-arginine. *J Biol Chem* **2004**, 279, 36788–36794.
- [82] Schechter, I. & Berger, A., On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* **1967**, 27, 157–162.
- [83] Band, A. M.; Määttä, J.; Kääriäinen, L. & Kuismanen, E., Inhibition of the membrane fusion machinery prevents exit from the TGN and proteolytic processing by furin. *FEBS Lett* **2001**, 505, 118–124.
- [84] Basak, A.; Jean, F.; Seidah, N. G. & Lazure, C., Design and synthesis of novel inhibitors of prohormone convertases. *Int J Pept Protein Res* **1994**, 44, 253–261.
- [85] Smith, R. E., Furin inhibitors. Patentanmeldung, **2004**, WO2007/046781 A1.
- [86] Bontemps, Y.; Scamuffa, N.; Calvo, F. & Khatib, A.-M., Potential opportunity in the development of new therapeutic agents based on endogenous and exogenous inhibitors of the proprotein convertases. *Med Res Rev* **2007**, 27, 631–648.
- [87] Basak, A. & Lazure, C., Synthetic peptides derived from the prosegments of proprotein convertase 1/3 and furin are potent inhibitors of both enzymes. *Biochem J* **2003**, 373, 231–239.
- [88] Basak, A.; Ernst, B.; Brewer, D.; Seidah, N. G.; Munzer, J. S.; Lazure, C. & Lajoie, G. A., Histidine-rich human salivary peptides are inhibitors of proprotein convertases furin and PC7 but act as substrates for PC1. *J Pept Res* **1997**, 49, 596–603.
- [89] Basak, A., Inhibitors of proprotein convertases. *J Mol Med* **2005**, 83, 844–855.
- [90] Villemure, M.; Fournier, A.; Gauthier, D.; Rabah, N.; Wilkes, B. C. & Lazure, C., Barley serine proteinase inhibitor 2-derived cyclic peptides as potent and selective inhibitors of convertases PC1/3 and furin. *Biochemistry* **2003**, 42, 9659–9668.
- [91] Angliker, H., Synthesis of tight binding inhibitors and their action on the proprotein-processing enzyme furin. *J Med Chem* **1995**, 38, 4014–4018.
- [92] Basak, A.; Khatib, A.-M.; Mohottalage, D.; Basak, S.; Kolajova, M.; Bag, S. S. & Basak, A., A novel enediynyl peptide inhibitor of furin that blocks processing of proPDGF-A, B and proVEGF-C. *PLoS One* **2009**, 4, e7700.

5 Literaturverzeichnis

- [93] Basak, A.; Cooper, S.; Roberge, A. G.; Banik, U. K.; Chrétien, M. & Seidah, N. G., Inhibition of proprotein convertases-1, -7 and furin by diterpines of *Andrographis paniculata* and their succinoyl esters. *Biochem J* **1999**, 338 (Pt 1), 107–113.
- [94] Podsiadlo, P.; Komiyama, T.; Fuller, R. S. & Blum, O., Furin inhibition by compounds of copper and zinc. *J Biol Chem* **2004**, 279, 36219–36227.
- [95] Jiao, G.-S.; Cregar, L.; Wang, J.; Millis, S. Z.; Tang, C.; O'Malley, S.; Johnson, A. T.; Sareth, S.; Larson, J. & Thomas, G., Synthetic small molecule furin inhibitors derived from 2,5-dideoxystreptamine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, 103, 19707–19712.
- [96] Coppola, J. M.; Bhojani, M. S.; Ross, B. D. & Rehemtulla, A., A small-molecule furin inhibitor inhibits cancer cell motility and invasiveness. *Neoplasia* **2008**, 10, 363–370.
- [97] Komiyama, T.; Coppola, J. M.; Larsen, M. J.; van Dort, M. E.; Ross, B. D.; Day, R.; Rehemtulla, A. & Fuller, R. S., Inhibition of furin/proprotein convertase-catalyzed surface and intracellular processing by small molecules. *J Biol Chem* **2009**, 284, 15729–15738.
- [98] Sielaff, F.; Than, M. E.; Bevec, D.; Lindberg, I. & Steinmetzer, T., New furin inhibitors based on weakly basic amidinohydrazones. *Bioorg Med Chem Lett* **2011**, 21, 836–840.
- [99] Garten, W.; Hallenberger, S.; Ortmann, D.; Schäfer, W.; Vey, M.; Angliker, H.; Shaw, E. & Klenk, H. D., Processing of viral glycoproteins by the subtilisin-like endoprotease furin and its inhibition by specific peptidylchloroalkylketones. *Biochimie* **1994**, 76, 217–225.
- [100] Rockwell, N. C.; Krysan, D. J.; Komiyama, T. & Fuller, R. S., Precursor processing by kex2/furin proteases. *Chem Rev* **2002**, 102, 4525–4548.
- [101] Gustafsson, D.; Elg, M.; Lenfors, S.; Börjesson, I. & Teger-Nilsson, A. C., Effects of inogatran, a new low-molecular-weight thrombin inhibitor, in rat models of venous and arterial thrombosis, thrombolysis and bleeding time. *Blood Coagul Fibrinolysis* **1996**, 7, 69–79.

- [102] Wiley, M. R.; Chirgadze, N. Y.; Clawson, D. K.; Craft, T. J.; Gifford-Moore, D. S.; Jones, N. D.; Olkowski, J. L.; Schacht, A. L.; Weir, L. C. & Smith, G. F., Serine protease selectivity of the thrombin inhibitor D-Phe-Pro-Agmatine and its homologs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1995**, 5, 2835 – 2840.
- [103] Steinmetzer, T. & Stürzebecher, J., Progress in the development of synthetic thrombin inhibitors as new orally active anticoagulants. *Curr Med Chem* **2004**, 11, 2297–2321.
- [104] Hanson, S. R. & Harker, L. A., Interruption of acute platelet-dependent thrombosis by the synthetic antithrombin D-phenylalanyl-L-prolyl-L-arginyl chloromethyl ketone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1988**, 85, 3184–3188.
- [105] Vyavahare, N.; Scott, N. A.; Hanson, S. R. & Kohn, J., In vitro and in vivo evaluation of the site-specific administration of d-phenylalanyl-l-prolyl-l-arginyl chloromethyl ketone (PPACK): a powerful thrombin inhibitor. *Journal of Controlled Release* **1993**, 27, 165 – 173.
- [106] Barlos, K.; Gatos, D.; Kapolos, S.; Papaphotiu, G.; Schäfer, W. & Wenqing, Y., Veresterung von partiell geschützten peptid-fragmenten mit harzen. Einsatz von 2-chlortritylchlorid zur synthese von Leu15 -gastrin I. *Tetrahedron Letters* **1989**, 30, 3947 – 3950.
- [107] Manku, S.; Laplante, C.; Kopac, D.; Chan, T. & Hall, D. G., A mild and general solid-phase method for the synthesis of chiral polyamines. Solution studies on the cleavage of borane-amine intermediates from the reduction of secondary amides. *J Org Chem* **2001**, 66, 874–885.
- [108] Chan, W. C. & White, P. D., *Fmoc solid phase peptide synthesis, a practical approach*. The Practical Approach Series, Oxford University Press, New York, **2000**.
- [109] Bernatowicz, M. S.; Wu, Y. & Matsueda, G. R., 1H-Pyrazole-1-carboxamidine hydrochloride an attractive reagent for guanylation of amines and its application to peptide synthesis. *J Org Chem* **1992**, 57, 2497–2502.
- [110] Dixon, M., The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem J* **1953**, 55, 170–171.
- [111] Becker, G. L.; Sielaff, F.; Than, M. E.; Lindberg, I.; Routhier, S.; Day, R.; Lu, Y.; Garten, W. & Steinmetzer, T., Potent inhibitors of furin and furin-like proprotein

5 Literaturverzeichnis

- convertases containing decarboxylated P1 arginine mimetics. *J Med Chem* **2010**, 53, 1067–1075.
- [112] Steinmetzer, T.; Batdorsdhjin, M.; Kleinwächter, P.; Seyfarth, L.; Greiner, G.; Reissmann, S. & Stürzebecher, J., New thrombin inhibitors based on D-cha-Pro-derivatives. *J Enzyme Inhib* **1999**, 14, 203–216.
- [113] Gustafsson, D.; Bylund, R.; Antonsson, T.; Nilsson, I.; Nyström, J.-E.; Eriksson, U.; Bredberg, U. & Teger-Nilsson, A.-C., A new oral anticoagulant: the 50-year challenge. *Nat Rev Drug Discov* **2004**, 3, 649–659.
- [114] Vieth, M.; Siegel, M. G.; Higgs, R. E.; Watson, I. A.; Robertson, D. H.; Savin, K. A.; Durst, G. L. & Hipskind, P. A., Characteristic physical properties and structural fragments of marketed oral drugs. *J Med Chem* **2004**, 47, 224–232.
- [115] Varma, M. V. S.; Obach, R. S.; Rotter, C.; Miller, H. R.; Chang, G.; Steyn, S. J.; El-Kattan, A. & Troutman, M. D., Physicochemical space for optimum oral bioavailability: contribution of human intestinal absorption and first-pass elimination. *J Med Chem* **2010**, 53, 1098–1108.
- [116] Garten, W.; Stieneke, A.; Shaw, E.; Wikstrom, P. & Klenk, H. D., Inhibition of proteolytic activation of influenza virus hemagglutinin by specific peptidyl chloroalkyl ketones. *Virology* **1989**, 172, 25–31.
- [117] Carrigan, C. N. & Imperiali, B., The engineering of membrane-permeable peptides. *Anal Biochem* **2005**, 341, 290–298.
- [118] Katayama, S.; Hirose, H.; Takayama, K.; Nakase, I. & Futaki, S., Acylation of octaarginine: Implication to the use of intracellular delivery vectors. *J Control Release* **2011**, 149, 29–35.
- [119] Campbell, N. A., *Biologie*. Spektrum Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 4. Auflage, **1997**.
- [120] Berg, J. M.; Tymoczko, J. L. & Stryer, L., *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, 5. Auflage, **2003**.
- [121] Fersht, A. R., The hydrogen bond in molecular recognition. *Trends in Biochemical Sciences* **1987**, 12, 301 – 304.

- [122] Kuhn, B.; Mohr, P. & Stahl, M., Intramolecular hydrogen bonding in medicinal chemistry. *J Med Chem* **2010**, 53, 2601–2611.
- [123] Naqui, A., What does I50 mean? *Biochem J* **1983**, 215, 429–430.
- [124] Bakowsky, H.; Richter, T.; Kneuer, C.; Hoekstra, D.; Rothe, U.; Bendas, G.; Ehrhardt, C. & Bakowsky, U., Adhesion characteristics and stability assessment of lectin-modified liposomes for site-specific drug delivery. *Biochim Biophys Acta* **2008**, 1778, 242–249.
- [125] Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes. Online Ressource, technische Anmerkung, <http://www.malvern.de/common/downloads/campaign/MRK656-01.pdf>.
- [126] Matsubara, T.; Sumi, M.; Kubota, H.; Taki, T.; Okahata, Y. & Sato, T., Inhibition of influenza virus infections by sialylgalactose-binding peptides selected from a phage library. *J Med Chem* **2009**, 52, 4247–4256.
- [127] Frankel, A. D. & Pabo, C. O., Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* **1988**, 55, 1189–1193.
- [128] Vivès, E.; Brodin, P. & Lebleu, B., A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem* **1997**, 272, 16010–16017.
- [129] Schmidt, N.; Mishra, A.; Lai, G. H. & Wong, G. C. L., Arginine-rich cell-penetrating peptides. *FEBS Lett* **2010**, 584, 1806–1813.
- [130] Fuchs, S. & Raines, R., Internalization of cationic peptides: the road less (or more?) traveled. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2006**, 63, 1819–1822, 10.1007/s00018-006-6170-z.
- [131] Morrison, J. F., The slow-binding and slow, tight-binding inhibition of enzyme-catalysed reactions. *Trends in Biochemical Sciences* **1982**, 7, 102 – 105.
- [132] Morrison, J. F. & Walsh, C. T., The behavior and significance of slow-binding enzyme inhibitors. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **1988**, 61, 201–301.
- [133] Jameson, G. W.; Roberts, D. V.; Adams, R. W.; Kyle, W. S. & Elmore, D. T., Determination of the operational molarity of solutions of bovine alpha-chymotrypsin,

- trypsin, thrombin and factor Xa by spectrofluorimetric titration. *Biochem J* **1973**, *131*, 107–117.
- [134] Bender, M. L.; Begué-Cantón, M. L.; Blakeley, R. L.; Brubacher, L. J.; Feder, J.; Gunter, C. R.; Kézdy, F. J.; Killheffer, J. V.; Marshall, T. H.; Miller, C. G.; Roeske, R. W. & Stoops, J. K., The determination of the concentration of hydrolytic enzyme solutions: alpha-chymotrypsin, trypsin, papain, elastase, subtilisin, and acetylcholinesterase. *J Am Chem Soc* **1966**, *88*, 5890–5913.
- [135] Chase, T. & Shaw, E., Comparison of the esterase activities of trypsin, plasmin, and thrombin on guanidinobenzoate esters. Titration of the enzymes. *Biochemistry* **1969**, *8*, 2212–2224.
- [136] Bravo, D. A.; Gleason, J. B.; Sanchez, R. I.; Roth, R. A. & Fuller, R. S., Accurate and efficient cleavage of the human insulin proreceptor by the human proprotein-processing protease furin. Characterization and kinetic parameters using the purified, secreted soluble protease expressed by a recombinant baculovirus. *J Biol Chem* **1994**, *269*, 25830–25837.
- [137] Brenner, C. & Fuller, R. S., Structural and enzymatic characterization of a purified prohormone-processing enzyme: secreted, soluble Kex2 protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1992**, *89*, 922–926.
- [138] Dang, Q. D. & Cera, E. D., A simple activity assay for thrombin and hirudin. *J Protein Chem* **1994**, *13*, 367–373.
- [139] Stone, S. R. & Hofsteenge, J., Kinetics of the inhibition of thrombin by hirudin. *Biochemistry* **1986**, *25*, 4622–4628.
- [140] Ingles, D. W. & Knowles, J. R., The stereospecificity of alpha-chymotrypsin. *Biochem J* **1968**, *108*, 561–569.
- [141] Steinmetzer, T.; Batdordshjin, M.; Pineda, F.; Seyfarth, L.; Vogel, A.; Reissmann, S.; Hauptmann, J. & Stürzebecher, J., New bivalent thrombin inhibitors with N(alpha)(methyl)arginine at the P1-position. *Biol Chem* **2000**, *381*, 603–610.
- [142] Schweinitz, A.; Steinmetzer, T.; Banke, I. J.; Arlt, M. J. E.; Stürzebecher, A.; Schuster, O.; Geissler, A.; Giersiefen, H.; Zeslawska, E.; Jacob, U.; Krüger, A. & Stürzebecher, J., Design of novel and selective inhibitors of urokinase-type plasmino-

- gen activator with improved pharmacokinetic properties for use as antimetastatic agents. *J Biol Chem* **2004**, 279, 33613–33622.
- [143] Schweinitz, A.; Stürzebecher, A.; Stürzebecher, U.; Schuster, O.; Stürzebecher, J. & Steinmetzer, T., New substrate analogue inhibitors of factor Xa containing 4-amidinobenzylamide as P1 residue: part 1. *Med Chem* **2006**, 2, 349–361.
- [144] Turk, D., *Weiterentwicklung eines Programmes für Molekülgraphik und Elektronendichte-Manipulation und seine Anwendung auf verschiedene Protein-Strukturaufklärungen*. Dissertation, Technische Universität München, München, Deutschland, **1992**.
- [145] Engh, R. A. & Huber, R., Accurate bond and angle parameters for X-ray protein-structure refinement. *Acta Crystallogr* **1991**, A47, 392–400.
- [146] Nicholls, A.; Sharp, K. A. & Honig, B., Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins* **1991**, 11, 281–296.
- [147] Kraulis, P. J., *MOLSCRIPT*: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *Journal of Applied Crystallography* **1991**, 24, 946–950.
- [148] Merritt, E. A. & Bacon, D. J., Raster3D: photorealistic molecular graphics. *Methods Enzymol* **1997**, 277, 505–524.
- [149] Lakadamyali, M.; Rust, M. J. & Zhuang, X., Endocytosis of influenza viruses. *Microbes Infect* **2004**, 6, 929–936.
- [150] Hajdin, K.; D'Alessandro, V.; Niggli, F. K.; Schäfer, B. W. & Bernasconi, M., Furin targeted drug delivery for treatment of rhabdomyosarcoma in a mouse model. *PLoS One* **2010**, 5, e10445.
- [151] Nguyen, N.; Glanz, D. & Glaesser, D., Fatty Acid Cytotoxicity to Bovine Lens Epithelial Cells: Investigations on Cell Viability, ecto-ATPase, Na⁺, K⁺-ATPase and Intracellular Sodium Concentrations. *Experimental Eye Research* **2000**, 71, 405 – 413.
- [152] Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **1983**, 65, 55–63.

5 Literaturverzeichnis

- [153] Schäfer, W.; Stroh, A.; Berghöfer, S.; Seiler, J.; Vey, M.; Kruse, M. L.; Kern, H. F.; Klenk, H. D. & Garten, W., Two independent targeting signals in the cytoplasmic domain determine trans-Golgi network localization and endosomal trafficking of the proprotein convertase furin. *EMBO J* **1995**, *14*, 2424–2435.
- [154] Jean, F.; Thomas, L.; Molloy, S. S.; Liu, G.; Jarvis, M. A.; Nelson, J. A. & Thomas, G., A protein-based therapeutic for human cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**, *97*, 2864–2869.
- [155] Komiyama, T.; VanderLugt, B.; Fugère, M.; Day, R.; Kaufman, R. J. & Fuller, R. S., Optimization of protease-inhibitor interactions by randomizing adventitious contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, *100*, 8205–8210.
- [156] Maisa, A.; Ströher, U.; Klenk, H.-D.; Garten, W. & Strecker, T., Inhibition of Lassa virus glycoprotein cleavage and multicycle replication by site 1 protease-adapted alpha(1)-antitrypsin variants. *PLoS Negl Trop Dis* **2009**, *3*, e446.
- [157] Matrosovich, M.; Matrosovich, T.; Garten, W. & Klenk, H.-D., New low-viscosity overlay medium for viral plaque assays. *Viol J* **2006**, *3*, 63.
- [158] Dimmock, N. J.; Easton, A. J. & Leppard, K. N., *Introduction to Modern Virology*. Blackwell Publishing, 6 Auflage, **2007**.
- [159] Kido, H.; Okumura, Y.; Takahashi, E.; Pan, H.-Y.; Wang, S.; Chida, J.; Le, T. Q. & Yano, M., Host envelope glycoprotein processing proteases are indispensable for entry into human cells by seasonal and highly pathogenic avian influenza viruses. *J Mol Genet Med* **2008**, *3*, 167–175.
- [160] Okumura, Y.; Takahashi, E.; Yano, M.; Ohuchi, M.; Daidoji, T.; Nakaya, T.; Böttcher, E.; Garten, W.; Klenk, H.-D. & Kido, H., Novel type II transmembrane serine proteases, MSPL and TMPRSS13, Proteolytically activate membrane fusion activity of the hemagglutinin of highly pathogenic avian influenza viruses and induce their multicycle replication. *J Virol* **2010**, *84*, 5089–5096.
- [161] Krysan, D. J.; Rockwell, N. C. & Fuller, R. S., Quantitative characterization of furin specificity. Energetics of substrate discrimination using an internally consistent set of hexapeptidyl methylcoumarinamides. *J Biol Chem* **1999**, *274*, 23229–23234.
- [162] Ukraincik, K. & Pikkiosh, W., Microprocessor-based radioimmunoassay data analysis. *Methods Enzymol* **1981**, *74 Pt C*, 497–508.

- [163] Halfman, C. J., Concentrations of binding protein and labeled analyte that are appropriate for measuring at any analyte concentration range in radioimmunoassays. *Methods Enzymol* **1981**, 74 Pt C, 481–497.
- [164] Morrison, J. F., Kinetics of the reversible inhibition of enzyme-catalysed reactions by tight-binding inhibitors. *Biochim Biophys Acta* **1969**, 185, 269–286.
- [165] Williams, J. W. & Morrison, J. F., The kinetics of reversible tight-binding inhibition. *Methods Enzymol* **1979**, 63, 437–467.
- [166] Henderson, P. J., A linear equation that describes the steady-state kinetics of enzymes and subcellular particles interacting with tightly bound inhibitors. *Biochem J* **1972**, 127, 321–333.
- [167] Zhang, L.; Goldammer, C.; Henkel, B.; Zühl, F.; Panhaus, G.; Jung, G. & Bayer, E., „Magic Mixture“, a powerful Solvent System for Solid-Phase Synthesis of „Difficult Sequences“. In *Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis, 3rd International Symposium*, R. Epton, Herausgeber, Mayflower Scientific Ltd., Birmingham, **1994**, 711.
- [168] Becker, G. L.; Lu, Y.; Strehlow, B.; Lindberg, I.; Bakowsky, U.; Garten, W. & Steinmetzer, T., Optimization of the P5-position in peptidomimetic furin inhibitors – Potential drugs for the treatment of highly pathogenic avian influenza, **2011**, in Vorbereitung.

A Publikationen

Zeitschriftenbeiträge

- Becker, G. L.; Sielaff, F.; Than, M. E.; Lindberg, I.; Routhier, S.; Day, R.; Lu, Y.; Garten, W. & Steinmetzer, T., Potent inhibitors of furin and furin-like proprotein convertases containing decarboxylated P1 arginine mimetics. *J Med Chem*, **2010**, 53, 1067-1075.
- Becker, G. L.; Lu, Y.; Strehlow, B.; Lindberg, I.; Bakowsky, U.; Garten, W.; & Steinmetzer, T., Optimization of the P5-position in peptidomimetic furin inhibitors – Potential drugs for the treatment of highly pathogenic avian influenza. **2011**, in Vorbereitung.

Eingereichte Patentanmeldungen

- WO2010048941 (A3), N-terminal modifizierte Tetrapeptidderivate mit C-terminalem Argininmetikum. Angemeldet am **29.10.2008**, veröffentlicht am 06.05.2010, Anmelder: Philipps-Universität Marburg, Erfinder: Steinmetzer, T., Becker, G. L., Garten, W.
- EP10151487, Verfahren zur Bestimmung der Aktivität der Transglutaminase Faktor XIIIa. Angemeldet am **22.01.2010**, nicht veröffentlicht, Anmelder: Philipps-Universität Marburg, Erfinder: Steinmetzer, T., Becker, G.L.

Tagungsbeiträge

- Becker, G.L., Steinmetzer, T., Potent inhibitors of furin and furin-like proprotein convertases containing decarboxylated P1 arginine mimetics. Poster, *Frontiers in Medicinal Chemistry*, DPhG/GDCh-Tagung, Münster, Deutschland, **März 2010**.
- Bayer, K.; Lennartz, F.; Lu, Y.; Becker, G.L.; Steinmetzer, T.; Kehr, K.; Herden, C.; & Garten, W., Importance of activated viral glycoprotein for spread of Borna disease virus in various cell cultures. Poster, *21st Annual Meeting of the Society for Virology*, Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Freiburg, Deutschland, **März 2011**.

A Publikationen

- Lu, Y.; Fehling, I.; Strecker, T.; Becker, G.L.; Steinmetzer, T.; & Garten, W., Newly designed peptidomimetics inhibit specific host cell subtilases necessary for propagation of distinct viruses. Poster, *21st Annual Meeting of the Society for Virology*, Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Freiburg, Deutschland, **März 2011**.

B Messparameter des Enzym-Tests und AMC-Eichkurve

Messparameter

Für die Messungen der Inhibitoren mit Furin in Puffer wurden immer die in Tabelle B.1 angegebenen Messparameter des verwendet.

Tabelle B.1: Messparameter des Plattenlesers Tecan SAFIRE II während der enzymkinetischen Messungen.

Parameter	Wert
XFLUOR4 Version	V 4.51
Firmware	V 1.60 07/2006 Safire2
Serial number	12904200017
Measurement mode	Fluorescence Top
Excitation wavelength	380 nm
Emission wavelength	460 nm
Excitation bandwidth	12 nm
Emission bandwidth	12 nm
Gain (Manual)	90
Number of reads	10
FlashMode	High sensitivity
Integration time	2000 μ s
Lag time	0 μ s
Plate definition file	NUN96ftNEW.pdf
Z-Position (Manual)	7107 μ m
Number of kinetic cycles	40
Kinetic interval (Minimal)	33 s

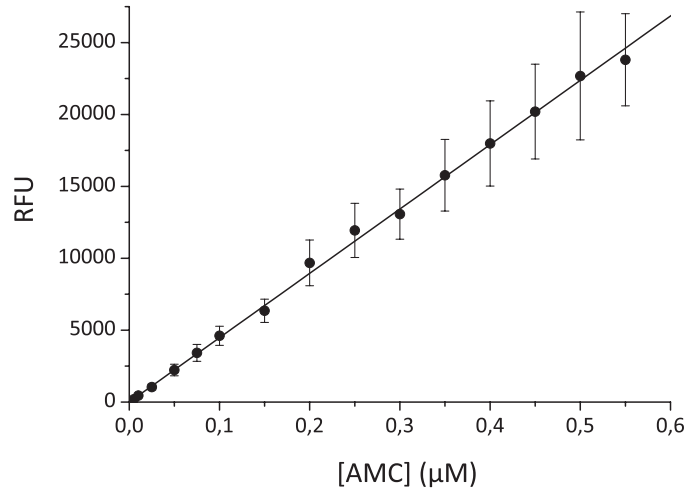
Eichkurve AMC

Während der enzymkinetischen Messungen wurde v mit der Einheit RFU/s bestimmt, wobei RFU für die vom Gerät detektierte Fluoreszenzeinheit steht. Für die Berechnung des K_i -Wertes ist es unerheblich, in welcher Einheit v angegeben wird, nach der Kurvenanpassung wird der Wert mit einer Konzentrationseinheit erhalten. Damit die gemessenen Fluoreszenzeinheiten aufgrund der Spaltung des Substrates Pyr-RTKR-AMC dennoch

B Messparameter des Enzym-Tests und AMC-Eichkurve

in eine Konzentration umgerechnet werden kann, ist am Tecan-Plattenleser unter identischen Messbedingungen wie für die Enzymkinetik eine Eichkurve mit AMC aufgenommen worden. Diese ist in Abbildung B.1 gezeigt. Die Umrechnung der Fluoreszenzeinheiten in

Abbildung B.1: AMC-Eichkurve in Furin-Messpuffer. Der Ausgangswert für die RFU bei einer AMC-Konzentration von null wurde von den Messwerten subtrahiert. Gezeigt sind Mittelwerte von 6 unabhängigen Eichkurven, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.



eine Konzentration kann direkt über die nachfolgende Gleichung erfolgen:

$$\text{Konzentration AMC } (\mu\text{M}) = \frac{RFU}{44751} \quad (\text{B.1})$$

Die Umrechnung der Geschwindigkeit v der Einheit RFU/s direkt in die Einheit $\mu\text{mol/s}$, kann über die nachstehende Gleichung erfolgen:

$$v[\text{RFU}/\mu\text{M}] = \frac{v[\text{RFU}/\text{s}]}{44751} \quad (\text{B.2})$$

C Virologische Methoden¹

C.1 Zellkulturen, Virus-Stamm- und Inhibitor-Lösungen

Die „Madin-Darby canine kidney“-Zelllinie (MDCK) wurde in „Dulbecco's Modified Eagle Medium“ (DMEM), versetzt mit Penicillin, Streptomycin, Glutamin und 10 % „Fetal Calf Serum“ (FCS), kultiviert. Die aviären Influenzaviren des Typs A/FPV/Rostock/34 (H7N1) wurden in embryonalen Hünereiern herangezogen. Die virusenthaltende, allantoide Flüssigkeit wurde durch Zentrifugation bei niedriger Drehzahl geklärt (4000 rpm, 10 min, 4 °C) und bei -80 °C gelagert.

Inhibitoren wurden mit DMSO zu einer Stammlösung der Konzentration 10 mM gelöst und bei -20 °C gelagert. Verdünnungen wurden immer in DMEM ohne den Zusatz von FCS direkt vor Verwendung hergestellt.

C.2 Zytotoxizitätstest

Die Viabilität von MDCK-Zellen, gezogen in 96er Mikrotiterplatten bis zur Konfluenz, wurde durch den MTT-Assay (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid-Assay, [152]) bestimmt. Dazu wurde der Zellüberstand nach 24 oder 48 h Inkubation entfernt, die Zellrasen mit PBS gewaschen und jede Zellprobe mit 50 µL einer Lösung aus 0,5 mg MTT pro mL DMSO für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die MTT-Lösung wurde dann vorsichtig entfernt. Um die gebildeten Formazan-Kristalle zu lösen, wurden zu jeder Kultur 100 µL DMSO gegeben. Nach 10 min Schütteln bei RT erfolgte Quantifizierung der lebenden Zellen durch ein Spektralphotometer bei einer spezifischen Absorption von 490 nm.

C.3 Immunfärbung

Zellkulturen wurden mit 4 % PFA in MEM (Minimal Essential Medium, Gibco) fixiert, mit PBS gewaschen und mit 0,3 % Triton-X-100 in PBS für 20 min permeabilisiert. Infizierte Zellen wurden gefärbt, indem sie zunächst mit FPV-Antiserum (Hase, 1:3500) für 1 h

¹Die virologischen Versuche wurden von Yinghui Lu, AG Garten, Institut für Virologie der Universität Marburg, vorbereitet und durchgeführt [111, 168].

C Virologische Methoden

und anschließend mit einem sekundären Antikörper gegen Hase (vom Esel), konjugiert mit HRP (Horse raddish Peroxidase, 1:3500) inkubiert wurden. Vor und nach Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurden die Zellen 5 min mit 0,05 % Tween in PBS gewaschen. Dann wurde Trueblue (1,2-Bis(5-amidino-2-benzofuranyl)ethylendiacetat²) als Peroxidase-Substrat zu den Zellen gegeben. Gefärbte Kulturen wurden mit H₂O gewaschen, um die Reaktion zu stoppen und anschließend getrocknet [157].

C.4 Bestimmung der Virusausbreitung

A/FPV/Rostock/34 (H7N1) aus allantoider Flüssigkeit wurde in PBS 10⁻⁶-fach verdünnt. Dann wurden 0,2 mL des verdünnten Virus (MOI=0,002) für die Infektion von MDCK-Zellen, gewachsen in 24er Kulturplatten, für die Infektion verwendet. Nach 18 h Inkubation wurden die Zellen mit 4 % PFA in MEM für 30 min fixiert und wie oben beschrieben infizierte Zellen durch Immunfärbung sichtbar gemacht.

C.5 Multizyklische Replikation und Plaque-Test

MDCK-Kulturen wurden mit A/FPV/Rostock/34 (H7N1) Influenzaviren bei einer MOI von 0,001 infiziert. Alle 24 h wurden 50 µL Proben aus den Überständen entnommen und für die Virus-Plaque-Titration verwendet [156]. Dabei wurden neue bodenhaftende MDCK-Kulturen in 96er Kulturplatten mit seriellen Verdünnungen der Viruslösung aus dem Überstand infiziert (10 µL pro Kultur). Nach 1 h Inkubation bei 37 °C mit 5 % CO₂ wurden die Viren entfernt und die Zellen 3× mit PBS gewaschen. Zum Überschichten der Zellen wurden 100 µL einer Lösung aus 1,2 % Avicel® in DMEM mit 2 % FCS zu jeder Kultur gegeben. Nach 40 h Infektion wurde die Schicht entfernt und die Zellen mit 4 % PFA in MEM für 30 min fixiert. Virusplaques wurden durch Immunfärbung, wie bereits beschrieben, sichtbar gemacht.

C.6 SDS-PAGE und Western-Blot Analyse

Gespaltenes und nicht gespaltenes Hämagglutinin von FPV wurde in An- und Abwesenheit von Inhibitoren getestet. Die Zellen wurden mit einer MOI von 10 infiziert. Nach 16–24 h Inkubation wurden Zellreste durch Zentrifugation bei 13 000 rpm für 10 min bei 4 °C entfernt. Die Viren im Überstand wurden durch Ultrazentrifugation bei 45 000 rpm für 1 h

²KPL, Gaithersburg, MD, USA

bei 4 °C pelettiert. Die Viren wurden in reduzierendem SDS-Probenpuffer resuspendiert und für 10 min bei 95 °C geheizt. Im Anschluss erfolgte die Analyse der viralen Proteine über Western-Blot mit einem Antiserum gegen FPV (Hase) und IRDye 800 Antikörper gegen Hase wie bereits beschrieben [32].

D Danksagung

Die Entstehung dieser Dissertation war nur möglich, weil mich in den letzten Jahren viele Menschen auf meinem Weg begleitet haben und mit stets mit fachlichem Rat oder mit freundschaftlichem Rückhalt zur Seite standen.

Allen voran danke ich meinem Betreuer Torsten Steinmetzer für das interessante Thema, an dem ich arbeiten durfte. Er hatte immer ein offenes Ohr für Fragen und scheute sich nicht, mir auch im Labor den ein- oder anderen Kniff zu zeigen (die MI-Nummern werden wohl wirklich besser auf den Deckel geschrieben...). Auch für viele anregende Diskussionen und den Feinschliff meines wissenschaftlichen Schreibstils möchte ich ihm danken. Die etlichen Arbeitskreisausflüge werden mir immer in Erinnerung bleiben, besonders die kleinen Anekdoten aus einem Land, das es heute nicht mehr gibt. . .

Etliche Male saßen wir zusammen, Wolfgang Garten und ich. Diskutierten über Viren oder Hämagglutinine und tauschten so Erfahrung und Fachkenntnis seinerseits mit Wissensdurst meinerseits. Ich muss sagen, dass ich wohl mehr davon profitiert habe, als er und dafür möchte ich ihm danken. Auch für sein Engagement, die Kooperation zwischen den Arbeitskreise zu vertiefen und für die vielen Vorschläge von virologischen Testmöglichkeiten meiner Verbindungen bin ich ihm dankbar.

Mindestens genauso viel Dank hat auch Yinghui Lu verdient. Sie war es, die die praktischen Arbeiten der virologischen Untersuchungen mit viel Fleiß und Gewissenhaftigkeit durchgeführt hat. Für meine Fragen war sie stets ein kompetenter Ansprechpartner.

Mein Dank richtet sich auch an Manuel Than. In seiner Arbeitsgruppe konnten einige meiner Verbindungen getestet werden. Durch den regen Austausch der Ergebnisse war es erst möglich, einige Strukturen zu optimieren. Furin wird sich bestimmt nicht mehr lange wehren, mit den Inhibitoren zu kristallisieren. . .

Ich danke auch Boris Strehlow und Udo Bakowsky für die Partikelmessungen, die sie an einigen Verbindungen durchgeführt haben. Ich konnte immer damit rechnen, auf meine Fragen eine Antwort zu bekommen und weiß die Zusammenarbeit zu schätzen.

Ein besonderer Dank richtet sich an Kornelia. Begonnen hat es mit einem Vertiefungspraktikum bei mir, während dem sie mich bereits kompetent bei meinen Arbeiten unterstützen konnte. Das Praktikum muss ihr wohl zugesagt haben, denn es schloss sich die Diplomarbeit bei uns an, in deren Verlauf wir den Syro zum Zittern brachten. Nun hat sie

D Danksagung

mich im Arbeitskreis beerbt und wird meine Forschung fortführen. Ich könnte mir keinen besseren Nachfolger wünschen.

Für etliche Synthesen, für die Unterstützung bei praktischen Arbeiten und für die lockere Atmosphäre im Labor möchte ich Kathleen danken. Sie war mir stets eine große Hilfe. Aber Auch bei allen anderen Mitgliedern des Arbeitskreises Steinmetzer, Danny, Maya, Sebastian, Frank und Zouhir, inklusive einem gewissen Herrn Hasewinkel möchte ich mich bedanken. Vor allem für die familiäre Atmosphäre, die gemeinsamen Mittagspausen und die hilfreichen Diskussionen, Grillen und Glühwein nicht zu vergessen.

Aber auch außerhalb der pharmazeutischen Chemie gibt es viele Menschen, die mich in den letzten Jahren unterstützt haben. Allen voran Tatjana, die auch dann für mich da war, wenn mal die Welt nicht so rosig aussah. Ihr habe ich zu verdanken, dass ich an so manchen Tagen wieder nach vorne schauen konnte. Jetzt freue ich mich erstmal auf die versprochene Currywurst und schreiende, fauchende Katzen. . .

Und dann sind da noch so viele Freunde, denen ich einfach mal sagen muss, dass es ohne sie nicht gegangen wäre. Schon gar nicht gegen Ende der Promotion. Ich bedanke mich dafür, dass ihr mich immer wieder aufgebaut und meine Angespanntheit ertragen habt. Allen voran Katharina und Nantke, Harry und Sven, Steffen und Momo sowie noch so viele andere Feuerwehrkameraden (fühlt euch genannt) und meinen Freunden aus der Heimat, die mir meine häufige Abwesenheit zu diversen Gelegenheiten nie übel genommen haben, danke ich dafür. Es wird wieder besser, versprochen.

Zuletzt, aber wirklich nicht als letztes möchte ich meiner Familie danken. Für die Unterstützung in jeglicher Form. Ohne euch geht es eben nicht.

„Well, I’m back,“ he said.

E Lebenslauf

Gero Lutz Becker, geboren am 15.07.1980 in Ulm

PRAKTISCHE ERFAHRUNGEN

07/2007-02/2011	Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Pharmazie, Institut für Pharmazeutische Chemie, AG Steinmetzer
Doktorand	Doktorarbeit zum Thema: „Entwicklung, Synthese und Charakterisierung neuartiger Furininhibitoren“
09/2006-06/2007	Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Biologie, Abteilung für Mikrobiologie, AG Buckel
Diplomand	Diplomarbeit zum Thema: "Klonierung und Charakterisierung der mutmaßlichen Indolacetat-Decarboxylase aus <i>Clostridium scatologenes</i> "
02/2005-08/2005	Institut de Chimie de la Matière Condensée de Bordeaux (ICMCB/CNRS), Université de Bordeaux, AG Heintz
Etudiant	Semesterarbeit zum Thema: „Entwicklung neuartiger Verfahren zur Herstellung transparenter Keramiken auf der Basis von Yttriumoxid“

BILDUNG UND ERSATZDIENST

10/2001-06/2007	Philipps-Universität Marburg, Studiengang Chemie (Diplom)
Studium	Abschluss als Diplom-Chemiker
07/2000-08/2001	Kreiskrankenhaus Bad Hersfeld
Zivildienst	Unfallchirurgische und allgemeinmedizinische Notaufnahme

E Lebenslauf

07/1997-06/2000 Modellschule Obersberg, Bad Hersfeld
Abitur Allgemeine Hochschulreife

EHRENAMTLICHE TÄTIGKEITEN

1991-Heute Ehrenamtliches aktives Mitglied der Freiwilligen Feuerwehr
Feuerwehr Mitglied in der FF Marburg-Mitte, 1. Zug. Momentane Aufgaben: Wahrnehmung von Führungsaufgaben in Einsatz und Ausbildung, Personalführung, Organisation und Vorbereitung des Ausbildungsdienstes auf Zug-, Stadt- und Landkreisebene, Einsatzleitung auf Ebene des Zugführers, Schwerpunkt Gefahrstoffbekämpfung ABC

5. Januar 2011 Gero Becker

F Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit:

Entwicklung, Synthese und Charakterisierung neuartiger Furininhibitoren

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 5. Januar 2011

(Unterschrift mit Vor- und Zuname)